

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

**00551**



NOMBRE: LUZ MARÍA GARCÍA PÉREZ

FECHA: 03 MARZO 2004

**UNAM  
POSGRADO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR  
DURANTE EL OSMOACONDICIONAMIENTO DE  
SEMILLAS DE MAÍZ.

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
**Maestra en Ciencias (Bioquímicas)**

**P R E S E N T A :**

**BIÓL. LUZ MARÍA GARCÍA PÉREZ**

Tutor: Dr. Jorge Vázquez Ramos



México, D. F.

Marzo, 2004



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

“Todo lo que sucede, sucede por una razón”.

Gabriel García Márquez

“Construir sobre lo que se tiene”

## Agradecimientos

Al Departamento de Bioquímica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada.

Al Doctor Jorge Vázquez, fue una prueba difícil para ambos.

A mis compañeros del laboratorio 114

A los Doctores Mario Rocha e Irma Bernal, por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo como parte de mi Comité Tutorial.

A los Doctores Carmen Wachter, Mario Rocha, Javier Plasencia, Sobeida Sánchez y Luis Felipe Jiménez, por sus observaciones en la revisión de este trabajo.

## Dedicatoria

A mi familia, no importa lo que suceda en el mundo, se que siempre habrá un lugar seguro para mi.

A mis padres, sin su apoyo no hubiese podido llegar a este momento.

A Nancy y a Mariano, es increíble todo lo que he recibido de ustedes .

A los nuevos integrantes de la familia, Roberto y Mariano, verlos cada día es un estímulo para seguir adelante y ser mejor.

A mis amigos del laboratorio 114, Edurne y Ruth, una amistad muy particular, a mis queridos Dairo y Pilo, no solo por sus enseñanzas académicas, sino por lo que he aprendido de la vida, a Doña Licha que siempre tuvo consuelo para mi en los peores momentos.

A mis niñas, Evangelina, Llaraí, Oralia y Xóchitl, mis mejores amigas, siempre. Por nuestros sueños.

A todos mis nuevos amigos del círculo de bailadores, los problemas son más ligeros en buena compañía.

A todas las personas que al pasar por mi vida me han cambiado y me ha hecho mejor.

A ti, porque aprendí que la vida es tan simple como la quieras ver.

## RESUMEN

El osmoacondicionamiento, mediante el empleo de un agente osmótico, es una estrategia con la que se busca elevar la calidad de las semillas, dándoles beneficios como, un aumento en el porcentaje final de germinación, una germinación más rápida y uniforme, además de tolerancia a la desecación, lo que permite almacenarlas después del tratamiento. Se ha propuesto que durante el osmoacondicionamiento, ocurren eventos similares a los observados durante las primeras horas de imbibición en condiciones óptimas. En el caso de maíz, se sabe que durante el osmoacondicionamiento hay síntesis de DNA pero no del tipo replicativo; posteriormente se observa síntesis de DNA de tipo replicativo además de la aparición más temprana de figuras mitóticas, respecto a las semillas control. Estos resultados sugieren que durante el osmoacondicionamiento las células del eje embrionario avanzan en el ciclo celular, pero al parecer no son capaces de pasar a la siguiente fase hasta que el agente osmótico es retirado.

En este trabajo, se caracterizó el comportamiento de las proteínas de las fases G1 y S, PCNA, Cdk-A, Ciclina D y una DNA polimerasa tipo  $\alpha$ , en semillas osmoacondicionadas y en la germinación posterior, los niveles de PCNA no variaron durante el osmoacondicionamiento y en la germinación posterior se observó una correlación entre el aumento de PCNA y la síntesis de DNA de tipo replicativo sugiriendo que, efectivamente el osmoacondicionamiento adelanta procesos dentro de la fase G1 del ciclo celular, pero habría un mecanismo que evite la entrada a la siguiente fase hasta que las condiciones sean adecuadas. Ninguna de las otras proteínas evaluadas, ni la medición de la actividad de DNA polimerasas mostraron cambios que pudieran estar asociados a los beneficios observados en semillas osmoacondicionadas.

## INDICE

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1	Recuperación del vigor en semillas.	3
1.1.1	Hidratación no controlada.	3
1.1.2	Hidratación controlada.	3
1.2	Omoacondicionamiento (OSMA).	4
1.2.1	Aspectos fisiológicos.	4
1.2.2	Cambios bioquímicos y moleculares.	8
1.3	Ciclo celular.	13
1.4	Ciclo celular en plantas.	16
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES.</b>	20
<b>III</b>	<b>HIPÓTESIS.</b>	23
<b>IV</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	24
4.1	Objetivo General.	24
4.2	Objetivos Particulares.	24
<b>V</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	25
5.1	Material Biológico.	25
5.2	Imbibición y OSMA de semillas de maíz.	25
5.3	Obtención del extracto crudo para los experimentos tipo Western blot.	26
5.4	Obtención del extracto crudo para evaluar la actividad de polimerasas.	27
5.5	Cuantificación de proteína por el método de Bradford.	27
5.6	Inmunoreconocimiento.	28
5.7	Evaluación de la actividad de polimerasas.	30

5.8	Tratamiento de los datos.	31
	<b>RESULTADOS.</b>	32
6.1	Evaluación fisiológica.	32
6.2	Germinación normal y OSMA.	34
6.2.1	Detección de los niveles de DNA polimerasa $\alpha$ , Cdk-A, Ciclina D y PCNA.	34
6.2.2	Determinación de la actividad de DNA polimerasas total durante OSMA.	43
6.3	Germinación normal vs. Germinación post-OSMA.	44
6.3.1	Detección de los niveles de DNA polimerasa $\alpha$ , Cdk-A, Ciclina D y PCNA.	44
6.3.2	Determinación de la actividad de DNA polimerasas $\alpha$ y $\delta$ .	49
6.4	Síntesis de conductas observadas en los experimentos de Inmunoreconocimiento	52
<b>VII</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	54
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	63
<b>IX</b>	<b>PERSPECTIVAS.</b>	65
<b>X</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	66
<b>XI</b>	<b>ANEXO DE SOLUCIONES</b>	75

## I. INTRODUCCIÓN.

Una de las características que permitió la invasión y el éxito de las plantas en la tierra fue el desarrollo de la semilla, una estructura especializada que contiene una reserva de nutrientes y al embrión, el cual posee los elementos necesarios para dar origen a una nueva planta. En un embrión se pueden reconocer las siguientes partes:

1. el hipocotilo, al que están unidos uno ó dos cotiledones,
2. la plúmula, de donde se originarán las hojas verdaderas,
3. uno ó dos cotiledones, que constituyen la primera fuente de nutrientes durante la germinación. En el caso del maíz el cotiledón se ha reducido formando el escutelo.
4. el coleoptilo, que es la parte basal del escutelo y que cubre las primeras hojas.
5. la raíz embrionaria, que dará origen a la radícula,
6. y la coleorriza, un tejido que envuelve a la raíz y que participa en el rompimiento de las capas que envuelven al embrión durante la germinación.

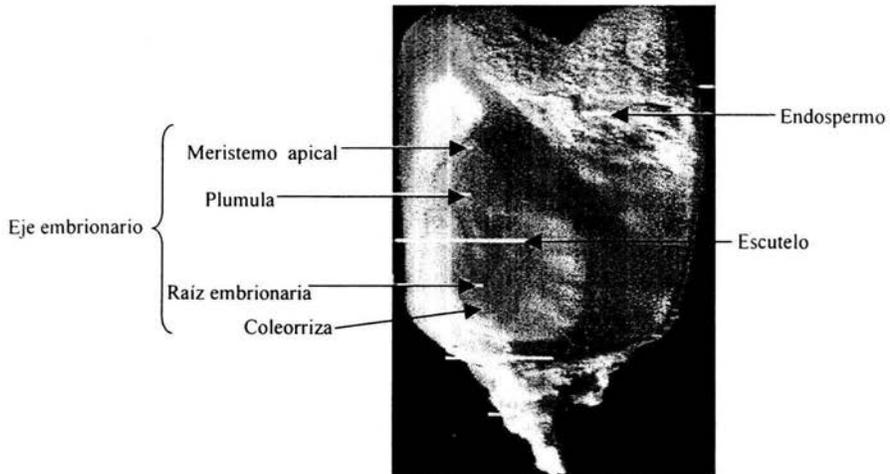


Fig. 1.1. Partes de una semilla de maíz

Una vez que la semilla se ha formado, pierde agua rápidamente y adquiere resistencia a la desecación por lo que se mantiene latente hasta que factores ambientales, fundamentalmente agua, temperatura y luz, le son favorables para que la germinación concluya adecuadamente (Bewley y Black, 1994).

La germinación, desde un punto de vista fisiológico, es definida como “los eventos que comienzan con la entrada de agua en la semilla –imbibición- y se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula se extiende rompiendo las estructuras que la rodean” (Bewley, 1997). Durante la entrada de agua se distinguen 3 fases, en la primera, la entrada de agua es rápida, seguida de una toma de agua constante (fase 2), hasta la protrusión radicular, con lo que concluye la germinación; posteriormente se registra otra entrada importante de agua, que se considera parte de los procesos del establecimiento de la plántula (Bewley, 1997). Durante las fases 1 y 2 la semilla es tolerante a la desecación; en la fase 3 la plántula es muy sensible a la falta de agua (Bradford, 1995).

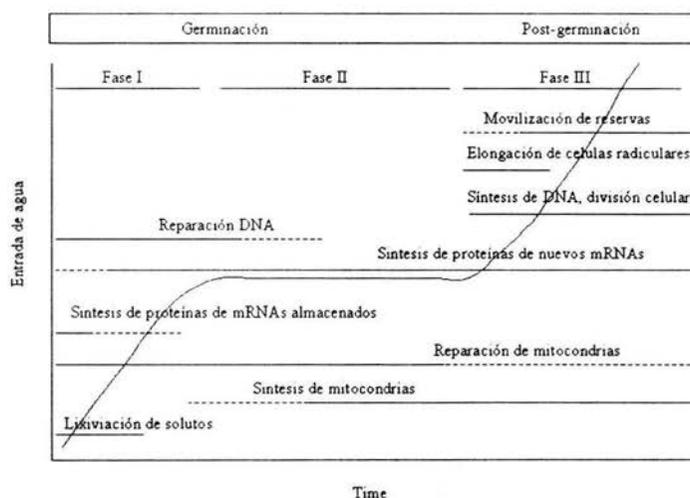


Fig. 1.2 Patrón de imbibición de una semilla y procesos bioquímicos y moleculares asociados (Tomado y modificado de Bewley, 1997)

Además del ambiente durante la germinación, también debe tomarse en cuenta el almacenamiento post-cosecha, pues condiciones tales como temperaturas extremas y porcentajes de humedad ambiental elevados pueden tener un efecto negativo en la semilla provocando la pérdida de vigor, el envejecimiento y la disminución de la viabilidad en un lote de semillas dado (Bewley y Black, 1994).

### **1.1 Recuperación del vigor en semillas.**

El vigor es el conjunto de propiedades que determinan el potencial para una emergencia rápida y uniforme y un desarrollo normal de las plántulas bajo un rango amplio de condiciones de campo (Pollock y Ross, 1972). La disminución en el vigor de la semilla puede ser particularmente grave en el caso de semillas importantes para el hombre, provocando la disminución del volumen de las cosechas; por lo que se han desarrollado tratamientos para mejorar el porcentaje de germinación de semillas deterioradas ó con el vigor disminuido. Tales tratamientos consisten en permitir la entrada de agua a la semilla, ya sea de manera regulada ó no.

#### **1.1.1 Hidratación no controlada.**

Puede darse colocando las semillas en papel absorbente húmedo ó sumergiendo las semillas directamente en agua. El proceso debe ser detenido antes de que la semilla entre a la fase 3

### **1.1.2 Hidratación controlada.**

En este caso el potencial hídrico es controlado previniendo la protrusión radicular. lo que se puede hacer empleando sistemas con partículas sólidas, donde el agua se distribuye entre la semilla y el acarreador sólido hasta que se alcanza el equilibrio por lo que la humedad no es suficiente para que haya protrusión; la otra alternativa es el uso de soluciones con NaCl, manitol, glicerol y polietilenglicol 8000 (PEG) que controlan el potencial hídrico durante la imbibición (Taylor, et al., 1998). En la actualidad el tratamiento con PEG es el más utilizado debido a que no posee actividad biológica, por lo que los efectos observados se pueden atribuir a la disminución en el potencial osmótico y no debidos al estrés salino, como ocurre con el uso de NaCl (Dell'Aquila y Spada, 1992).

Los tratamientos de capacitación reciben su nombre del efecto que tienen sobre las semillas; así por ejemplo si la imbibición es llevada a cabo con agua por periodos cortos se denomina hidroacondicionamiento y si el control en la entrada de agua es debido a la regulación del potencial osmótico, entonces el tratamiento es llamado osmoacondicionamiento (Bradford, 1995).

## **1.2 OSMOACONDICIONAMIENTO (OSMA).**

### **1.2.1 Aspectos fisiológicos**

Tal como en el caso de la elección de las condiciones óptimas de almacenaje y germinación, cuando se osmoacondicionan ó hidroacondicionan semillas se deben buscar las condiciones para cada especie; los factores que han de considerarse son la temperatura, la duración del tratamiento y en el caso del OSMA, el potencial osmótico óptimo.

El cálculo del potencial osmótico adecuado es fundamental, ya que se ha observado que hay un intervalo óptimo de potencial osmótico, por arriba del cual es posible observar protrusión radicular durante el tratamiento y por otra parte, si el potencial osmótico de la solución es muy bajo, puede provocar el efecto contrario, observándose una disminución de la viabilidad. Así se ha mostrado en el caso de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), donde las semillas en soluciones con potenciales osmóticos menores a -0.8 MPa permitieron la germinación mientras potenciales osmóticos mayores provocaron una pérdida de viabilidad de hasta el 40% (Sánchez-Jiménez et al., 1997). En el caso de maíz, potenciales osmóticos menores a -1.6 MPa permiten la germinación de las semillas (Cruz-García et al., 1995). La protrusión radicular durante el OSMA representa un problema pues como ya se mencionó anteriormente, al tiempo que emerge la radícula, la plántula se vuelve muy sensible a la desecación por lo que las semillas ya no pueden ser almacenadas.

En resumen, las condiciones que se deben cubrir para considerar que un lote de semillas ha sido osmoacondicionado adecuadamente son que durante el tratamiento no se observe protrusión radicular y que una vez que las semillas se encuentran en condiciones óptimas de humedad no muestren pérdida de viabilidad y que su germinación sea más rápida y uniforme; además, los beneficios alcanzados deben ser preservados si las semillas son llevadas a su contenido de humedad original (Bradford, 1986).

En la tabla 1.1 se indican las condiciones de OSMA para algunas semillas de importancia agrícola.

Especie	Potencial hídrico	Temperatura	Duración	Referencia
Trigo <i>Triticum durum Norba'</i>	-1.5 MPa	20°C	24-72 h	Dell'Aquila y Spada, 1992
Chile <i>Capsicum annum</i>	-1.1 y -1.5 MPa	20°C	Entre 2 y 12d	Saracco, et al., 1995
Girasol <i>Helianthus annuus 'Mirasol'</i>	-2 MPa	15°C	7d	Chojnowsky, et al., 1997
Lechuga <i>Lactuca sativa 'Empire'</i>	-1.5 MPa	20°C	Entre 10 y 24h	Tarquis y Bradford, 1992
Jitomate <i>Lycopersicum esculentum 'Moneymaker'</i>	-1 MPa	20°C	Entre 1 y 12 d 8d	Liu et al., 1993 Liu et al. 1996
<i>'Elko'</i>	-1.0 MPa	15°C	Entre 3 y 7 d	Özbingöl et al., 1998.
Frijol <i>Phaseolus vulgaris</i>	-0.8 MPa	25°C	Entre 3 y 7 d	Sánchez-Jiménez, et al., 1997
Maíz <i>Zea mays 'Chalqueño'</i>	-1.7 MPa	25°C	Entre 1 y 10 d	Cruz-García et al., 1995

Tabla 1.1 Condiciones de OSMA para algunas especies

Además de lo anterior, los estudios para comprender los fenómenos que ocurren durante el OSMA han mostrado otros rasgos fisiológicos.

Como ya se mencionó, durante la imbibición es posible detectar 3 fases en la entrada de agua. Cuando se siguió el patrón de imbibición en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y de frijol (*P. vulgaris*) durante el OSMA, se registró un patrón en la entrada de agua, similar al comportamiento descrito durante las fases I y II durante la germinación normal, aunque después de la meseta que correspondería a la fase II, solo se observó la entrada de agua

rápida correspondiente a la fase III cuando se retiro el agente osmótico, de modo que el aumento en la tasa de germinación después del OSMA puede deberse a un acortamiento en el proceso de imbibición de las semillas (Tarquis y Bradford, 1992, Sánchez-Jiménez et al., 1997).

Si bien el OSMA provee de varios beneficios a las semillas, también se ha observado que si el tratamiento se da por períodos prolongados puede provocar la disminución en la resistencia de las semillas a condiciones adversas, como las utilizadas en los tratamientos de envejecimiento artificial de semillas, que se realizan para determinar su calidad. Esto se ha observado en el caso de semillas de girasol, que al ser osmoacondicionadas por más de 10 días muestran una menor longevidad, durante el almacenamiento posterior (Chojnowsky et al., 1997). A partir de estos resultados podría proponerse que también la vida de almacén se acortará después del OSMA, lo cual ha sido mostrado para el caso de semillas de jitomate (Alvarado y Bradford, 1988).

Por otro lado, el acondicionamiento de semillas de jitomate (*L. esculentum*) (Özbingöl et al., 1998) y de remolacha azucarera (*B. vulgaris*) (Capron et al, 2000) provoca que las semillas puedan germinar a concentraciones más bajas de oxígeno y en un rango de temperaturas más amplio, respecto a las semillas que no han sido osmoacondicionadas, aunque la respuesta germinativa sigue mostrando un patrón similar a lo que se observa en el caso de semillas control, disminuyendo la tasa de germinación conforme la concentración de oxígeno baja ó cuando la temperatura se aleja de un óptimo de entre 25 y 30°C.

Las semillas para las que se han establecido las condiciones de OSMA y que se han estudiado de manera más profunda corresponden en su mayoría a especies que se emplean para el consumo humano y para las que es deseable la optimización de su manejo en cuanto a producción; sin embargo también se han hecho algunos estudios encaminados a emplear

el OSMA como una herramienta para aumentar la tasa de germinación en especies que pueden ser empleadas para la restauración de áreas naturales degradadas ó deterioradas, como es el caso de las semillas de pasto de las especies *Elymus lanceolatus*, *Pseudoroegneria spicata*, *Poa sandbergii* y *Sitanion hystrix* (Hardeegree, 1996) y *Elymus elymoides* (Hardeegree et al., 2002). Para estas especies se han establecido, de acuerdo a los aspectos ya mencionadas, las condiciones de OSMA que les permitiría competir más favorablemente en ambientes donde otras especies más agresivas las han desplazado.

Sobre la importancia que pueda tener el OSMA en especies no domesticadas, se ha propuesto que en los bancos de semillas en suelos es posible detectar un fenómeno similar al OSMA pues se sabe que las semillas del arbusto *Wigandia urens* germinan más rápida y uniformemente que las semillas que han sido osmoacondicionadas cuando permanecen enterradas durante algún tiempo (González-Zertuche et al., 2001), aunque dada la cantidad de factores que pueden influir a las semillas en estas condiciones el sistema de enterramiento hace el estudio muy complejo.

Por otro lado, al mismo tiempo que se han estudiado los cambios fisiológicos provocados por el OSMA, también se ha mostrado interés por los cambios a niveles bioquímico y molecular.

#### **1.1.2.1 Cambios bioquímicos y moleculares.**

Los primeros reportes en este aspecto mostraron que los tratamientos de imbibición por períodos cortos provocaban un aumento en la síntesis de RNA y de proteínas en semillas de centeno (Sen y Osborne, 1974); posteriormente Coolbear y Grierson (1979) observaron

que en semillas de jitomate aumentaba la cantidad de RNA ribosomal y Clarke y James (1991) observaron en semillas de puerro un aumento significativo de RNAs de transferencia.

Recientemente se han realizado búsquedas de genes que serían afectados por el OSMA. De semillas de coliflor se aisló un transcrito que al parecer codificaría para una proteasa y aunque no se sabe si desempeña algún papel en la germinación, es interesante el que la cantidad de RNA mensajero aumente en semillas durante OSMA, a niveles superiores a los detectados durante la germinación (Fujikura et al., 1995).

Otro RNA mensajero que se ha visto que cambia en respuesta al OSMA se encontró en semillas de canola (*Brassica napus*), el cuál codifica para una proteína denominada BnPIP1 perteneciente a la familia de las acuaporinas, proteínas que forman canales que permiten la entrada específica de agua a la célula y su expresión se incrementa en semillas que han sido osmoacondicionadas, no así la expresión de otra acuaporina, Bn $\gamma$ -TIP2 la que solo aumenta después de la protrusión radicular, sugiriendo que la primera participaría en la entrada de agua a la semilla en las etapas tempranas de la germinación (Gao et al., 1999).

Los avances en las técnicas de proteómica han permitido examinar los cambios en el perfil de proteínas que se dan cuando las semillas son embebidas y cuando son hidro- y osmoacondicionadas. Gallardo y colaboradores (2001), emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* y determinaron que la mayoría de las proteínas presentes en la semilla seca no cambiaba durante la imbibición; solamente 39 proteínas mostraron cambios durante la imbibición y en semillas acondicionadas sólo pudo observarse el aumento en los productos de degradación de proteínas de almacenaje pertenecientes a la familia de las crucíferas 12S y un aumento en la cantidad de tubulina y de proteínas de estrés térmico (LEA, por sus

siglas en inglés Late Embriogenesis Abundant). Acerca de lo que ocurría durante OSMA en cuanto a las proteínas de almacenaje y a la tubulina ya se habían hecho estudios en los que se habían encontrado resultados similares a los obtenidos en este análisis proteómico.

En semillas de remolacha azucarera (*B. vulgaris*) se ha estudiado la globulina 11S, una proteína de almacenamiento muy abundante en ésta especie, se ha observado que, durante las primeras de germinación se da la solubilización de la subunidad básica de esta proteína; interesantemente, durante el OSMA también se observa dicha solubilización (Job et al., 1997).

Respecto a la tubulina, se ha encontrado que esta se acumula durante las primeras horas de imbibición de semillas de jitomate (*L. esculentum*) y esta acumulación también se da cuando las semillas son osmoacondicionadas y además, si después del tratamiento las semillas son llevadas a su contenido de humedad original, la cantidad de tubulina permanece alta comparada con las semillas control (de Castro et al., 2000), por lo que se ha propuesto que esta acumulación podría ser responsable, al menos en parte, del adelanto observado en la germinación.

Se ha observado que algunas proteínas pertenecientes a la familia LEA sufren cambios durante el OSMA. Durante la formación de semilla, éstas se acumulan hacia las etapas tardías de maduración y desecación de las semillas. Se sabe que en semillas de frijol algunas de las proteínas LEA así como su nivel de transcrito disminuyen conforme transcurre el tiempo de OSMA. Por otro lado, durante los dos primeros días de OSMA en maíz también se observa una disminución en transcritos y proteínas, pero si el tratamiento continua, produce un aumento en la cantidad de estas proteínas (Campos-Álvarez et al., 2002). En las etapas tempranas de la germinación la cantidad de proteínas LEA disminuye

en ambos casos; lo anterior evidencia las diferencias que pueden darse en la percepción bioquímica del OSMA entre las especies.

Dado que las fluctuaciones en la cantidad de las proteínas no indica si éstas se encuentran activas ó no, también se ha monitoreado la actividad de algunas enzimas.

Una proteína que juega un papel muy importante durante la germinación es la endo- $\beta$ -mananasa, pues durante las primeras horas de imbibición se eleva su actividad ya que participa en el debilitamiento de las capas que rodean al embrión. En semillas de lechuga se ha visto que durante el OSMA ocurre un aumento en la actividad de esta enzima, que equivale a entre el 60 y el 70% de la actividad que se detecta cuando las semillas se embeben en condiciones óptimas (Nascimento et al., 2001).

En semillas de girasol (*Helianthus annuum*) durante el OSMA se da un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa, además de la aparición de una isoforma adicional de esta última. Estas enzimas participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Bailly et al., 2000), por lo que se ha sugerido que el control de esas especies durante OSMA sea uno de los mecanismos que posteriormente favorecen la germinación de las semillas.

Ya que uno de los usos del OSMA es devolver a semillas envejecidas el vigor y que una de las características de estas semillas es la disminución en su capacidad de síntesis de etileno, en la que participa la ACC-oxidasa, era de esperarse que esta enzima mostrara cambios cuando las semillas perdían vigor y cuando se osmoacondicionaban. En semillas de girasol el OSMA permite que la actividad de esta enzima se recupere y, como se sabe que la actividad de esta enzima depende de la integridad de la membrana, se ha sugerido que uno de los efectos del OSMA es permitir la reparación de las membranas (Chojnowsky

et al, 1997). Por otra parte, mientras que en semillas con alto vigor el OSMA tiene poco efecto sobre la actividades de la malato deshidrogenasa, la glutamato deshidrogenasa y al menos dos esterasas, en semillas envejecidas y posteriormente osmoacondicionadas las actividades de estas enzimas se recuperan notablemente, a niveles similares a los encontrados en semillas que no fueron sometidas a ningún tratamiento (Shatters et al., 1994). La correlación observada entre la recuperación del vigor y el aumento en las actividades de las proteínas mencionadas, sugiere un papel importante para éstas en la germinación.

Ya que la mayoría de los fenómenos descritos también son observados durante las primeras horas de imbibición se ha sugerido que durante el acondicionamiento ocurren procesos bioquímicos semejantes a los que ocurren durante las primeras horas de la germinación.

Uno de los tópicos que han causado más controversia es, si durante el OSMA de semillas de distintas especies se da replicación del DNA y/o división celular. Se sabe que la mayoría de las células de un eje embrionario seco se encuentran en estado quiescente, con un contenido 2C de DNA (Deltour y Jacqmar, 1974) y que cuando las condiciones son adecuadas, las células replican su DNA, se elongan y eventualmente se dividen (Bewley y Black, 1994). Al parecer, el que ocurra la replicación del DNA durante el OSMA solo ha sido documentada consistentemente para el caso del jitomate, aunque no se ha observado que el ciclo celular continúe hacia mitosis, por lo que se ha propuesto que las células del eje embrionario quedarían estacionadas en la fase G2 del ciclo celular (de Castro, et al. 2000); también en semillas de chile se ha visto un aumento en el contenido de DNA que correspondería a la entrada a la fase S durante el OSMA (Lanteri et al., 1993). En otras especies como puerro, trigo, nuez (Bray, 1995), frijol (Sánchez-Jiménez, et al., 1997) y

maíz (Cruz-García et al., 1995), se detectan niveles basales de síntesis de DNA que no se asemejan a los niveles esperados en replicación y se ha sugerido que más bien puedan estar asociados a procesos de reparación del DNA, que finalmente son parte importante de los cambios que ocurren durante el tratamiento y que contribuyen con los beneficios observados durante la germinación de estas semillas.

## **1.2 Ciclo celular**

Para su estudio, el ciclo celular se ha dividido en 4 fases: la fase S, en la que se da la replicación del DNA, la fase G2 en la que la célula verifica que el DNA se haya replicado correctamente, la fase M en la que la célula se divide y finalmente la fase G1, en la que la célula deberá tomar la decisión de volver a replicar su genoma.

Durante el ciclo celular en células eucariotes se encuentran activas dos familias de proteínas muy importantes, las ciclinas cuyas cantidades varían a lo largo del ciclo y las cinasas dependientes de ciclinas ó Cdks. Las ciclinas se reconocen estructuralmente por la presencia de dos dominios característicos, la caja de ciclinas formada por alrededor de 100 aminoácidos y que es el dominio responsable de la interacción con las Cdks y la caja de destrucción localizada en el extremo amino terminal (Dewitte y Murray, 2003); por otro lado, las Cdks se caracterizan por la presencia de una secuencia PSTAIRE, ó variantes de ésta, que es importante para la unión a las ciclinas (Mironov et al., 1999). Estas dos familias proteicas forman heterodímeros y poseen actividad de cinasa de serina y treonina para sustratos específicos. Dada la importancia de la formación de los complejos Ciclina/Cdk, se ha encontrado que la célula regula su actividad a distintos niveles: transcripcional, post-transcripcional, mediante fosforilaciones y desfosforilaciones activadoras y desactivadoras,

por asociación de proteínas inhibidoras, a través de su localización subcelular y por degradación (Martín-Castellanos, 1997).

Al inicio de G1 se forma el complejo ciclina D-Cdk4/6; su actividad de cinasa puede ser bloqueada por la asociación de proteínas inhibidoras, las cuales se agrupan en dos familias, las Cip/Kip en donde se encuentran p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> y, por otro lado, la familia Ink4 en la que se encuentran p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup> y p18<sup>Ink4c</sup> (Sherr y Roberts, 1999). En presencia de señales mitogénicas, la actividad de cinasa del complejo se activa siendo su principal blanco la proteína de retinoblastoma (Rb). La importancia de esta proteína radica en su capacidad para asociarse, por un lado, al factor transcripcional E2F-DP inhibiendo la progresión del ciclo y por otro lado a complejos con actividad de desacetilasa con capacidad para remodelar la cromatina induciendo silenciamiento transcripcional. Ya que Rb posee múltiples sitios de fosforilación, se requiere de otro complejo, CicE-Cdk2 que en la fase G1 tardía la fosforila en sitios distintos a los fosforilados por CicD-Cdk4/6 y la mantiene en un estado inhibido.

La asociación de Rb a E2F-DP es importante porque este factor transcripcional se une a secuencias de DNA presentes en muchos promotores de genes cuyos productos participan en la fase S, de modo que se evita que la célula entre a la fase S hasta que llegue la señal, a través de la activación de CicD-Cdk4/6 (Trimarchi y Lees, 2001).

Cuando E2F-DP es liberado se induce la expresión de genes codificantes para varias proteínas, entre las que se encuentran reguladores del ciclo celular como cicE, cicA, Cdc2, Cdc25, E2F y Rb, enzimas que participan en la biosíntesis de nucleótidos como la dihidrofolato reductasa, la timidilato sintetasa y la timidina cinasa además de proteínas que se pueden encontrar en los orígenes de replicación como Cdc6, Orc1 y las proteínas MCM (por su nombre en inglés MiniChromosome Maintenance) (Trimarchi y Lees, 2001).

En la replicación del DNA participan una gran cantidad de proteínas. Los orígenes de replicación son reconocidos por la presencia de 6 proteínas ORC, 6 proteínas MCM, las proteínas Cdc6 y Cdt1 (Liang y Stillman, 1997). La activación del origen se da por la fosforilación de algunas de estas proteínas y las cinasas involucradas son CicE-Cdk2 y DDK, un heterodímero formado por Cdc7 y Dbf4 con actividad de cinasa que fosforila a las proteínas MCM, promoviendo su actividad de helicasa (Ishimi, 1997) abriendo la doble cadena de DNA con lo que se permite la entrada de la maquinaria de replicación. La primera proteína en unirse a la cadena es RPA quien permite la entrada de un complejo con actividad de DNA primasa-DNA polimerasa; la primasa se encarga de sintetizar un oligoribonucleótido con un extremo 3'-OH que puede ser reconocido por la polimerasa  $\alpha$  que entonces **polimeriza** un oligodesoxiribonucleótido, el extremo del cual es reconocido por la proteína RFC que coloca a PCNA, un homotrímero que forma un anillo alrededor del DNA. PCNA **puede** ser reconocido por proteínas de la maquinaria de replicación (FEN1, DNA ligasa I y DNA polimerasas  $\epsilon$  y  $\delta$ ), participantes en el ciclo celular (p21, Cdk2) e involucradas en la reparación del DNA (XP-G) (Kelman, 1997). La procesividad de la DNA polimerasa  $\delta$ , (la capacidad para agregar nucleótidos a la cadena de DNA en un solo evento de unión) depende de su asociación con PCNA. La replicación del DNA se da en una cadena de modo continuo y en la otra de manera discontinua; en esta última se requiere eliminar los cebadores por proteínas como la RNasa H, a la vez que la DNA polimerasa  $\delta$  y/o  $\epsilon$  agrega los desoxinucleótidos faltantes. Finalmente es necesario unir los fragmentos de DNA mediante la DNA ligasa.

Cuando la replicación del DNA ha terminado, la célula entra a la fase G2 donde se asegura de que la replicación ha sido completa y correcta. La entrada a la fase M es

controlada por otro complejo con actividad de cinasa, CicB-Cdc2, el cual debe ser activado para dar paso a la mitosis.

La fase M es por sí sola un evento altamente complejo, pues requiere de cambios que involucran a toda la célula. Las fosforilaciones conducidas por CicB-Cdc2 tienen como consecuencia, entre otras cosas, el desensamblaje de la membrana nuclear y el rearrreglo del citoesqueleto, fundamentales para el reparto del material genético en las dos células hijas.

### **1.3 Ciclo celular en plantas**

Los estudios en plantas han mostrado que los procesos básicos del ciclo celular se conservan, aunque la planta ha desarrollado sus propias estrategias para poder adaptarse a su ambiente.

Se han podido identificar genes que codifican a miembros de las familias de ciclinas y de Cdks de varias especies de plantas entre las que podemos mencionar *Arabidopsis thaliana*, tabaco, alfalfa y maíz (Dewitte y Murray, 2003)

Las Cdks mejor caracterizadas han sido las tipo A y B; Cdk-A posee el motivo PSTAIRE, una de las características que distinguen a las Cdks. La regulación de esta proteína se da a nivel postraducciona, pues su actividad de cinasa es máxima en G1/S y G2/M, aunque la cantidad de transcrito y de proteína permanece constante (Mironov, et al., 1999). También se han observado diferencias entre tejidos, pues su expresión es muy alta en tejidos en proliferación y sólo está presente en pequeñas cantidades en tejidos diferenciados (Segers et al., 1996). La otra cinasa dependiente de ciclinas es la Cdk-B; en las especies estudiadas su actividad de cinasa está restringida a la transición G2/M

(Mironov et al., 1999). Además también se han aislado una Cdk tipo C y otra tipo E. aunque su papel no ha sido establecido (De Witte y Murray, 2003).

Se han podido aislar ciclinas tipo D de distintas especies. En *Arabidopsis thaliana*, el sistema mejor estudiado, se han identificado 10, aunque no todas han sido caracterizadas. Se ha visto que CicD2;1 y CicD3;1 pueden asociarse a Cdk-A, pero no a Cdk-B (Healy et al., 2001); además, un complejo con actividad de cinasa formado por CicD2-CdkA aislado de un cultivo de células de trigo es capaz de fosforilar, *in vitro*, a Rb de maíz (Bonnioti y Gutierrez, 2001). Por otro lado, la expresión del gen de CicD3;1 es inducida por sacarosa y por citocininas, además de que la actividad de cinasa asociada a estos complejos también responde a señales externas, elevándose en presencia de citocininas (Riou-Khamlichi et al., 2000).

En *Arabidopsis thaliana* se han detectado 10 ciclinas tipo A y 3 tipo B. En el caso de las ciclinas A la actividad de la cinasa asociada muestra un pico en S y otro en la transición G2/M (Mironov et al., 1999), mientras la actividad asociada a las ciclinas B se restringe a la transición G2/M y a M (Ito, 2000).

Dado que en sistemas animales uno de los mecanismos de regulación de los complejos ciclina-Cdk que participan en la transición G1/S es mediante la asociación de inhibidores, la búsqueda de estas proteínas en plantas permitió la detección de un grupo de 7 proteínas denominadas KRPs ó ICKs, cuya homología con los inhibidores Kip/Cip se limita al carboxilo terminal. En experimentos de doble híbrido ninguna de estas proteínas es capaz de interactuar con Cdk-B y solo las KRPs 1, 2 y 7 se unen a Cdk-A (De Veylder et al., 2001). Además la proteína es capaz de disminuir la actividad de cinasa de Cdk-A y en plantas transgénicas afecta el número de células y la morfología de la planta (Wang et al., 2000). A nivel transcripcional cada KRP responde de modo distinto a la presencia de

sacarosa, lo que refuerza la idea de que participan en procesos distintos que pueden estar asociados ó no a proliferación celular (Richard et al., 2002).

Otras proteínas que se han aislado de plantas son las homólogas al factor transcripcional E2F y su proteína asociada DP. En arroz se han encontrado secuencias consenso de unión para E2F-DP en los promotores de varios genes, como los que codifican para PCNA (Kosugi y Ohashi, 2002), MCMs y ribonucleótido reductasa; además, se ha demostrado la funcionalidad de las dos secuencias de unión a E2F presentes en el promotor de PCNA de *Arabidopsis* para unir E2F-DP (Egelkroust et al., 2002).

Rb también se ha aislado de plantas y recientemente se ha mostrado en *Arabidopsis thaliana* que se puede asociar a proteínas remodeladoras de la cromatina y que este complejo puede inducir silenciamiento génico (Rossi et al., 2003).

Finalmente, en plantas se han aislado y caracterizado los homólogos de varias proteínas que participan en la replicación del DNA, entre las que podemos mencionar a ORC1 (Kimura et al., 2000), DNA polimerasas tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  (Luque et al., 2000, García et al., 1997, Coello y Vázquez-Ramos, 1992) y PCNA (Herrera et al., 2000) entre otras.

El conocimiento adquirido hasta ahora indica que los mecanismos generales para que la célula pase de una fase a otra son similares a los presentes en animales, donde un complejo ciclina-Cdk con especificidad de sustrato se encarga de empujar a la célula de una fase a otra. En el caso de la transición G1/S la vía Rb-E2F se encuentra conservada. El aislamiento de la gran mayoría de las proteínas homologas a la maquinaria de replicación y las interacciones que hasta ahora se han descrito también apuntan a una mecánica similar a la descrita en animales (Fig. 1.3) .

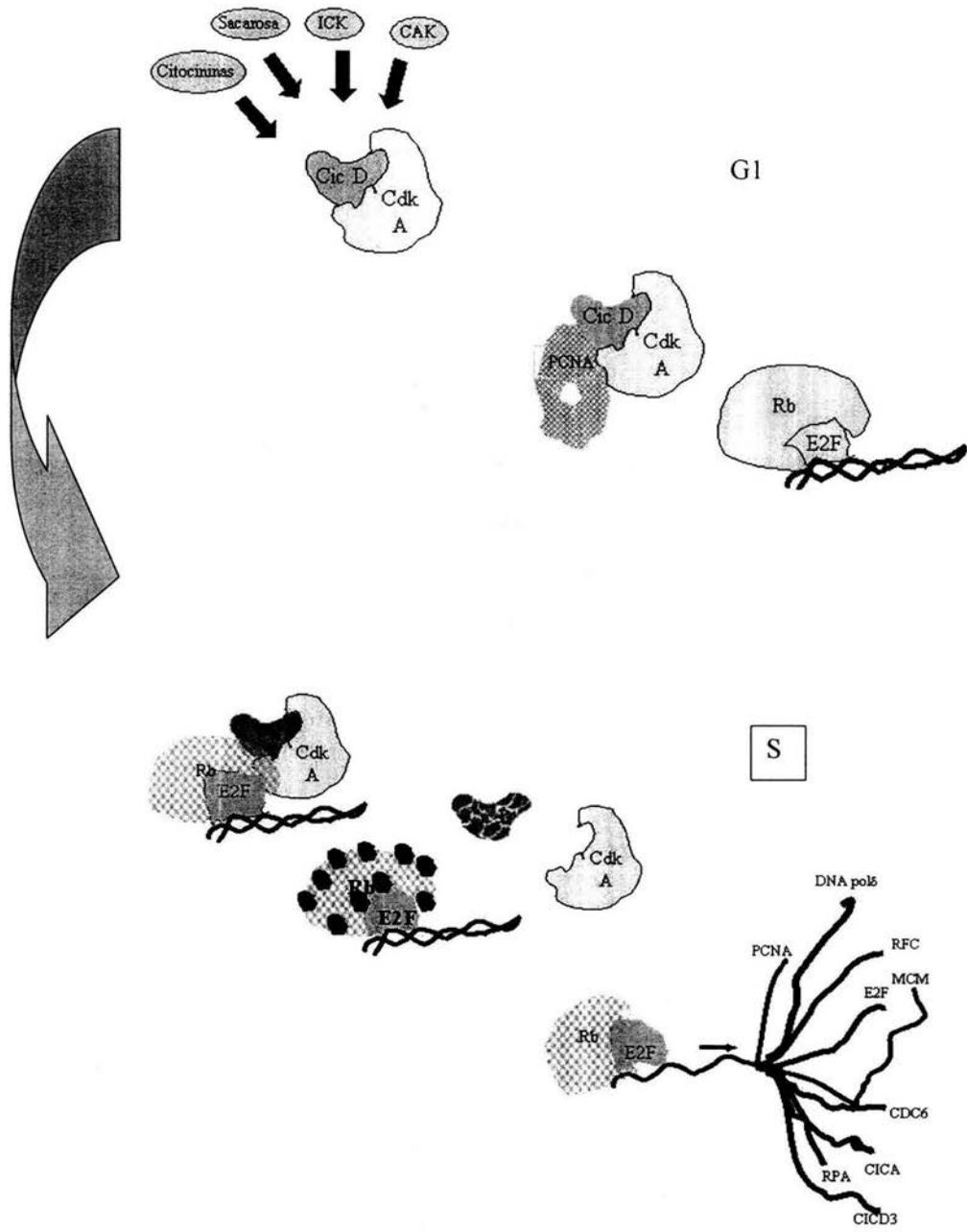


Fig. 1.3 Esquema de la transición G1/S del ciclo celular en plantas

## II. ANTECEDENTES

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a la investigación de los cambios moleculares que ocurren en semillas de maíz durante las primeras horas de la germinación, así como la influencia de las hormonas benziladenina y ácido abscísico, enfocándose a los eventos asociados al ciclo celular, particularmente a las fases G1 y S y a la transición entre éstas.

1) Se estableció que en ejes embrionarios de maíz, el 90% de las células se encuentran en fase G1 (Baiza et al., 1989). Cuando las semillas se embeben es posible detectar síntesis de DNA de tipo replicativo entre las 12 y 15 horas de la imbibición (Reyes et al., 1991).

2) PCNA es una de las proteínas que nuestro grupo ha estudiado más profundamente. Con el uso de un anticuerpo homólogo se ha podido establecer su presencia en semilla seca y que su cantidad aumenta conforme avanza el tiempo de imbibición, presentando su máximo a las 24 horas. Cuando las semillas son embebidas en presencia de citocininas, las cuales aceleran la germinación, se favorece su acumulación, encontrándose niveles similares a los del control a las 6h de imbibición; por el contrario, con ácido abscísico el cuál inhibe la germinación, no se observaron cambios en la cantidad de la proteína; esta correlación entre el avance de la germinación y la acumulación de PCNA sugiere un papel para PCNA dentro del proceso germinativo (Herrera et al., 2000).

3) Una Ciclina tipo D se ha detectado en semillas de maíz usando anticuerpos heterólogos; además usando un anticuerpo dirigido contra la región PSTAIRE se pudieron detectar dos proteínas tipo Cdk-A. Con experimentos de inmunoprecipitación, se estableció que la posible CicD es capaz de formar un complejo con actividad de cinasa con una de estas Cdks, cuya actividad desaparece conforme avanza la germinación. Respecto a la otra

Cdk también posee actividad de cinasa, pero ésta se incrementa conforme avanza la germinación, aunque por el momento no se sabe a que tipo de Ciclina pueda estar asociada, ya que la Ciclina D reportada disminuye gradualmente hasta que a las 20 horas ya no es detectable, lo que se esperaría si se considera que durante la germinación las células reasumen su actividad, avanzando hacia la fase S y que, en sistemas animales se ha observado que conforme las células avanzan hacia esta fase, la Ciclina D gradualmente se degrada (Cruz-García et al., 1998).

4) Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo dirigido contra una proteína Cdk-A aislada de maíz, dicho anticuerpo se ha caracterizado y se está empleando para establecer el comportamiento de la Cdk-A durante la germinación de maíz bajo distintas condiciones (Dairo Orjuela, datos no publicados).

5) Las DNA polimerasas están presentes en semilla seca y son funcionales, al evaluar su actividad *in vitro*. Su purificación parcial mostró la presencia de 3 actividades y su caracterización indica que se trata de polimerasas tipo  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\beta$  (García et al., 1997).

6) La polimerasa mejor caracterizada ha sido la tipo  $\alpha$ ; mediante el uso de un anticuerpo homólogo se demostró que la proteína mantenía niveles constantes durante la germinación, pero se detectó un aumento gradual en la actividad (Coello et al., 1992). Cuando se acelera la germinación con el uso de citocininas, la actividad de esta enzima se eleva importantemente, sugiriendo la importancia de la DNA polimerasa  $\alpha$  dentro de la germinación (Gómez-Roig y Vázquez-Ramos, 2002)

6) Cruz-García y colaboradores (1995) mostraron que el OSMA de semillas de maíz provocó que durante la germinación se diera una aceleración en la síntesis de DNA

(detectándose la incorporación de timidina tritiada mediante autorradiografía), observándose entrada a la fase S entre las 4 y 6 horas de imbibición

La evidencia obtenida no solo en maíz sino en otras especies de semillas permite suponer que durante el OSMA en el eje embrionario se dan cambios similares a los que ocurren en las fases I y II de la germinación normal. En el caso de maíz, la evidencia sugiere que el tratamiento permite que en la germinación posterior las células entren de un modo más rápido a la fase S, aunque se desconoce como se establecen y regulan estos fenómenos.

### **III. HIPÓTESIS.**

Si el OSMA de semillas de maíz provoca la detención de las células del eje embrionario en un punto del ciclo celular previo a S, entonces las semillas sujetas a este tratamiento no mostrarán cambios en los niveles de PCNA, ciclina D y Cdk-A, así como en los niveles y actividad de las DNA polimerasas. Durante la germinación post-OSMA deberá darse un aumento rápido en la cantidad de PCNA así como en los niveles y actividad de las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$ ; asimismo se espera una rápida disminución en la cantidad de ciclina D lo que deberá correlacionar con una caída en la actividad de la cinasa asociada a esta proteína.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Establecer los cambios que se dan en los niveles y actividad de algunas proteínas características de las fases G1 y S del ciclo celular en las semillas de maíz cuando se osmoacondicionan durante distintos tiempos y en las primeras horas de la germinación post-OSMA

### **4.2 Objetivos particulares**

- Determinar el comportamiento de los niveles de proteína de PCNA, Ciclina D y Cdk-A en semillas osmoacondicionadas a distintos tiempos y durante las primeras horas de germinación post-OSMA.
- Observar si hay efectos sobre los niveles de proteína y en la actividad de la DNA polimerasas tipo  $\alpha$ , así como sobre la actividad de la DNA polimerasa tipo  $\delta$  en el OSMA y en la germinación post-OSMA.

## **V MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Material biológico**

Se utilizaron semillas de maíz 'Chalqueño' de la cosecha 2001, compradas en el municipio de Valle de Chalco, Estado de México.

La preparación de todas las soluciones empleadas se detalla en el anexo de soluciones.

### **5.2 Imbibición y OSMA de semillas de maíz.**

Antes de los tratamientos las semillas fueron desinfectadas por 5 minutos con Captan ® para controlar la proliferación de hongos, se colocaron sobre papel Whatman para eliminar el exceso de funguicida y se pusieron en tres condiciones distintas;

- Imbibición normal, en la que se colocaron las semillas envueltas en toallas húmedas de papel en una caja Petri, dentro de una bolsa de plástico y se incubaron a 25°C durante 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas.
- Osmocondicionamiento, para el cual las semillas desinfectadas se pusieron en una caja Petri con polietilenglicol 8000 al 38%, el cuál proporciona un potencial osmótico de -1.7 MPa (Cruz-García, et al., 1995), con una proporción de 1 ml por cada eje embrionario y se incubaron a 25°C durante 1, 2, 3, 5, 7 y 10 días.
- Imbibición post-OSMA. Transcurridos 10 días de OSMA las semillas se lavaron con agua corriente para eliminar el PEG 8000 y se envolvieron en toallas húmedas de papel durante 3, 6 y 9 horas, dentro de una bolsa de plástico.

Una vez transcurridos los tiempos indicados para cada tratamiento, se realizó la extracción manual de los ejes embrionarios y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

En todos los casos se procuró hacer la extracción de proteína durante las siguientes 24h a la obtención de los ejes.

Los extractos que sirvieron como fuente de proteína para los experimentos de Western blot se hicieron a partir de lotes de 20 semillas, mientras que los que se emplearon para evaluar la actividad de polimerasas se hicieron a partir de 50 ejes embrionarios.

### **5.3 Obtención del extracto crudo de proteínas para los experimentos tipo Western blot.**

Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Los ejes correspondientes a cada uno de los tratamientos se maceraron en un mortero con pistilo, en presencia de 2 ml de buffer de homogeneización y 200 µl de un coctel de inhibidores de proteasas Complete®, después se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio eliminando de este modo la mayoría de los restos celulares y lípidos: este procedimiento se repitió dos veces más, para eliminar por completo la fracción lipídica. Se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford en cada extracto obtenido y se hicieron alícuotas de 50 µl que se almacenaron a -70°C para minimizar la degradación de proteínas.

#### **5.4 Obtención del extracto crudo para evaluar la actividad de DNA polimerasas.**

Al igual que en la obtención de proteína para experimentos tipo Western blot, todo el proceso se hizo a 4°C; los ejes embrionarios se maceraron en un mortero con 5 ml de buffer de homogeneización y 100 µl de solución de inhibidores de proteasas Complete ®. La mezcla se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos, la fase soluble fue transferida a un tubo de policarbonato y se centrifugó a 63 000 rpm durante una hora para eliminar restos celulares, lípidos y poliribosomas que pudieran interferir con la medición de la actividad de DNA polimerasas y/o el fraccionamiento de las actividades específicas correspondientes a las DNA polimerasas tipo  $\alpha$  y  $\delta$ .

#### **5.5 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.**

Para determinar la concentración de proteína de los extractos obtenidos, se preparó una solución stock de albúmina de suero bovino (BSA) (1µg/µl) a partir de la cual se tomó la cantidad necesaria para obtener concentraciones de 2, 4 ,6 ,8 y 10 µg/ml. Por otro lado, se tomó 1µl y tanto a las muestras de BSA como a las muestras problema se les añadieron 800µl de reactivo de Bradford, se llevó a un volumen de 1ml con agua desionizada e inmediatamente se registró la absorbancia en el espectrofotómetro a 280 nm. Con los datos obtenidos con la 0 BSA se construyó una curva patrón en la que se interpolaron los datos de los extractos proteicos.

## 5.6 Inmunoreconocimiento

Se prepararon geles de poliacrilamida con una concentración de 5% para el gel apilador y de 14% para el gel separador cuando se detectó a las proteínas PCNA, Ciclina D2 y Cdk-A y del 10% para detectar a la DNA polimerasa tipo  $\alpha$ . Estos geles se cargaron con 20  $\mu$ g de proteína de los extractos de interés, de ejes de semillas embebidas en condiciones normales, de ejes provenientes de semillas con distintos tiempos de OSMA y de ejes de semillas que fueron embebidas después del OSMA. Una vez que las proteínas se separaron en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante un sistema semiseco en un aparato LKB (Pharmacia Biotech). La transferencia se hizo durante una hora a 75 mA por cada gel, empleando buffer de transferencia. Para verificar que se estaba empleando la misma cantidad de proteína, se hizo la tinción del gel y de la membrana de PVDF empleando solución de Bradford y rojo de Ponceau respectivamente. Posteriormente la membrana se lavó durante 10 minutos con PBS 1x, para eliminar el colorante y se incubó durante una hora con solución de bloqueo que, posteriormente se cambió, y a ésta se agregó el primer anticuerpo a la dilución correspondiente (Tabla 5.1)

Proteína de interés	PCNA	Ciclina D2	Cdk-A	DNA polimerasa $\alpha$
Origen de la proteína empleada como antígeno	Proteína completa de maíz sobreexpresada en <i>E. coli</i>	Fragmento de la proteína de maíz sobreexpresada en <i>E. coli</i>	Proteína completa de maíz sobreexpresada en <i>E. coli</i>	Holoenzima de maíz purificada por cromatografía
1er anticuerpo Dilución Tiempo incubación	1 : 2000 2 horas	1 : 2000 3 horas	1 : 6 000 1 hora	1:6 000 1 hora
Lavados 1er anticuerpo	-10 min. PBS 1x -10 min. PBS 1x + NaCl 0.5M -10 min. PBS 1x	-10 min. PBS 1x -10 min. PBS 1x -10 min. PBS 1x	-10 min. PBS 1x -10 min. PBS 1x + NaCl 0.5M -10 min. PBS 1x	-10 min. PBS 1x -10 min. PBS 1x + NaCl 0.5M -10 min. PBS 1x
Referencia	Herrera et al., 2000	Gutiérrez-Aguilar, 2004	Dairo Orjuela, no publicado	Coello y Vázquez-Ramos, 1995

Tabla 5.1. Condiciones empleadas en los experimentos tipo Western blot para detectar a las proteínas PCNA.

Ciclina D2, Cdk-A y DNA polimerasa tipo  $\alpha$ .

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el primer anticuerpo, se hicieron 3 lavados para eliminar cualquier posible unión inespecífica y se incubó durante una hora con solución de bloqueo en la que se diluyó el anticuerpo secundario (1 : 10 000) dirigido contra las IgGs de conejo y conjugado con peroxidasa. Al término de la incubación con el segundo anticuerpo la membrana se volvió a lavar tres veces con las condiciones empleadas para cada uno de los anticuerpos primarios. Todos estos procedimientos se realizaron a 25°C.

La visualización de las proteínas se logró colocando las membranas en las soluciones del kit ECL (Amersham Biosciences), el cual contiene  $H_2O_2$  y un reactivo que cuando entra en contacto con la peroxidasa que esta conjugada al anticuerpo secundario, la reacción se detecta exponiendo placas fotográficas a la membrana.

## **5.7 Evaluación de la actividad de polimerasas**

### **-Medición de la actividad**

Inmediatamente después de obtener el extracto proteico de los ejes embrionarios sometidos a los distintos tratamientos, se tomaron 5  $\mu$ l y se agregaron a 45  $\mu$ l de mezcla de reacción, que contiene los elementos necesarios para que las DNA polimerasas incorporen desoxinucleótidos, incluyendo timidina marcada con tritio, a un molde de DNA. Los tubos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C y la reacción se detuvo agregando 3ml de ácido tricloroacético al 20%; para obtener el DNA sintetizado y que puede ser rastreado detectando la incorporación de radiactividad, la mezcla se pasó a través de filtros de fibra de vidrio (Millipore) empleando un sistema al vacío. Para favorecer que los filtros se secaran, se enjuagaron con etanol al 90% y se pusieron a 50°C durante 30 minutos. Los filtros se colocaron en viales que contenían 2.5ml de liquido de centelleo. La lectura de la incorporación de radiactividad se hizo en un contador de centelleo y con los datos obtenidos sobre la concentración de proteína se normalizaron los resultados obtenidos.

## 5.8 Tratamiento de los datos

En el caso de los experimentos de inmunoreconocimiento, al gel de poliacrilamida y a la placa obtenida de un experimento correspondiente a cada extracto obtenido, se les hizo una densitometría, los valores obtenidos se normalizaron tomando como referencia los resultados obtenidos en semilla seca, dándole el valor de 1. Se obtuvo el promedio y la desviación estandar y estos resultados fueron graficados.

## VI RESULTADOS

### 6.1 Evaluación fisiológica

Para evaluar el vigor de las semillas y asegurar las condiciones adecuadas de osmoacondicionamiento de las semillas empleadas en este estudio, se decidió hacer una curva de germinación. Se emplearon 3 repeticiones con lotes de 25 semillas para cada tratamiento. Para osmoacondicionar las semillas se probaron las condiciones reportadas por Cruz-García et al. (1995). Después del tratamiento, las semillas se lavaron con agua corriente, se envolvieron en toallas de papel húmedas, se colocaron en una bolsa de plástico y se incubaron a 25°C. Se registró el número de semillas que germinaron y se elaboró la curva de germinación que se muestra en la Fig. 1, donde se observa cómo en los lotes osmoacondicionados se registró protrusión radicular desde las 24 horas, al menos 8h antes que en las semillas control; también el tiempo en que las poblaciones evaluadas alcanzaron el 50% de la germinación fue diferente pues en los lotes control esto se dio entre las 46 y 48 horas, mientras que en las semillas osmoacondionadas esto sucedió alrededor de las 32 horas. Por otro lado, después de 50 horas de germinación, en los lotes control solo se obtuvo el 81% de la germinación, mientras que los lotes de semillas osmoacondionadas mostraron un aumento en el porcentaje final de germinación, obteniéndose valores de entre el 91 y el 97%. Las diferencias obtenidas entre los distintos tiempos de OSMA y las semillas control fueron significativas y, aunque se registraron algunas variaciones entre los distintos tiempos de OSMA, estos no fueron estadísticamente significativas.

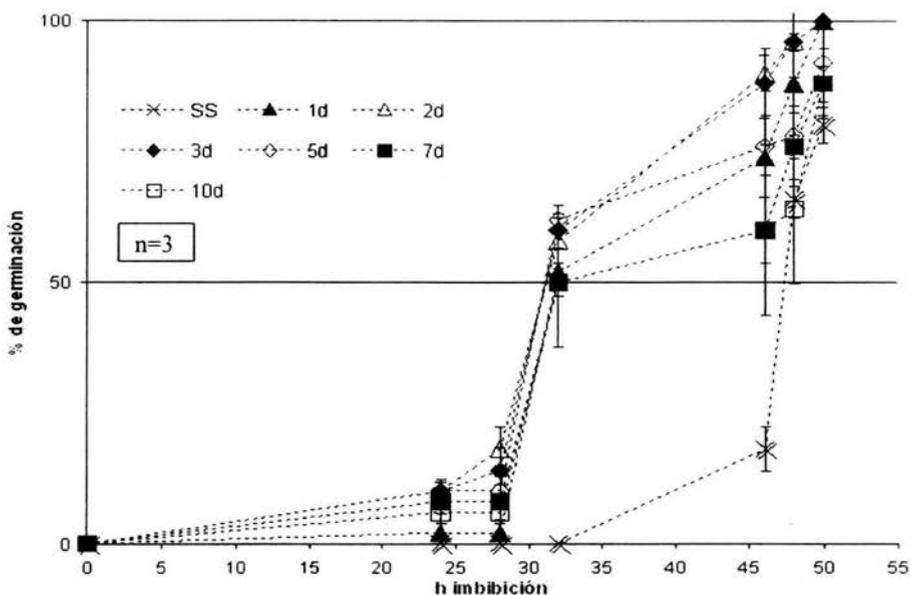


Fig. Efecto del OSMA en la velocidad de germinación. Se presenta la curva de germinación de semillas control (SS) y de semillas osmoacondicionadas por 1, 2, 3, 5, 7, y 10 días.

Con estos resultados se verificó la eficiencia del tratamiento y, se pudo determinar que, entre cada tiempo de OSMA no hubo diferencias significativas en los parámetros fisiológicos evaluados durante la imbibición; para determinar el efecto del tratamiento y si la prolongación del OSMA provocaba algún cambio sobre el avance del ciclo celular en las células del eje embrionario, se evaluó el comportamiento de proteínas involucradas en la transición G1/S del ciclo celular. Se osmoacondicionaron lotes de 20 semillas, se obtuvo el extracto crudo tal como se describe en material y métodos y este se empleó como fuente de proteína para hacer experimentos Western blot. Cada uno de los experimentos se hizo en extractos obtenidos a partir de 3 lotes de semillas distintos. Además en cada extracto el experimento se realizó por triplicado.

Estudios previos en el laboratorio han mostrado una correlación entre el tiempo de imbibición y la acumulación de PCNA, por lo que se decidió seguir el comportamiento de esta proteína durante el OSMA; por otro lado se sabe que los niveles de DNA polimerasa  $\alpha$  no cambia durante la germinación (Coello y Vázquez-Ramos, 1995); era por tanto importante establecer si su presencia era afectada por el OSMA ó si su comportamiento era similar a lo que se observaba en condiciones normales de germinación. De igual modo en el caso de CicD y Cdk-A, la variación en los niveles podría sugerir procesos particulares al OSMA, debidos al estrés osmótico, y no solo un adelanto de los eventos tempranos de germinación, por lo que se hicieron experimentos para rastrear cada proteína, empleando extractos correspondientes a ejes embrionarios obtenidos de semillas embebidas en condiciones normales y semillas osmoacondicionadas y embebidas. Con este tipo de experimentos se podría determinar si el comportamiento de las proteínas se modificaba por efecto del OSMA de un modo similar a lo que ocurre durante las primeras horas de imbibición ó si los cambios pudiesen estar asociados al estrés que significa el OSMA para la semilla.

## **6.2 Germinación normal y OSMA.**

### **6.2.1 Detección de los niveles de DNA polimerasa $\alpha$ , Cdk-A, Ciclina D y PCNA**

Para establecer las fluctuaciones en los niveles de proteínas de interés durante la imbibición se usaron extractos de ejes embrionarios de semillas secas, embebidas en condiciones normales y osmoacondicionadas por los tiempos ya mencionados en material y métodos.

La proteína PCNA fue detectada por un anticuerpo homólogo y se observó como una banda de 29 kDa (Fig. 2), que presentó un aumento gradual conforme avanzó el tiempo de imbibición, como ya se reportó anteriormente (Herrera et al., 2000).

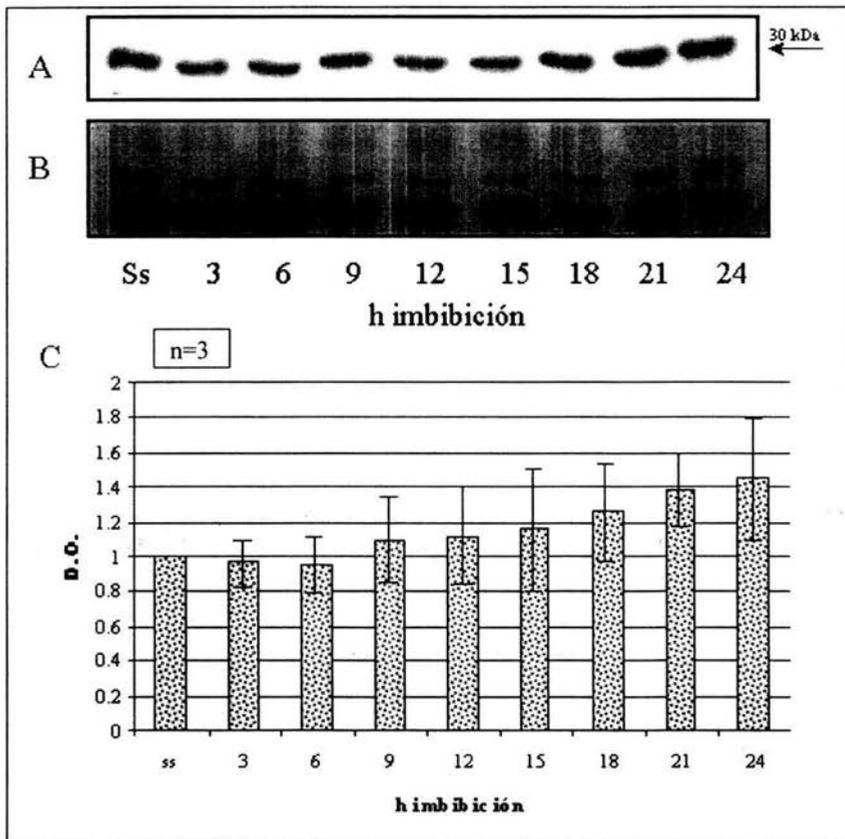


Fig. 2. Niveles de la proteína PCNA en ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS) y embebidas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas. (A) Detección de PCNA, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

Por otro lado, en ejes de semillas osmoacondicionadas (Fig. 3) aun cuando se observaron algunas fluctuaciones, éstas no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

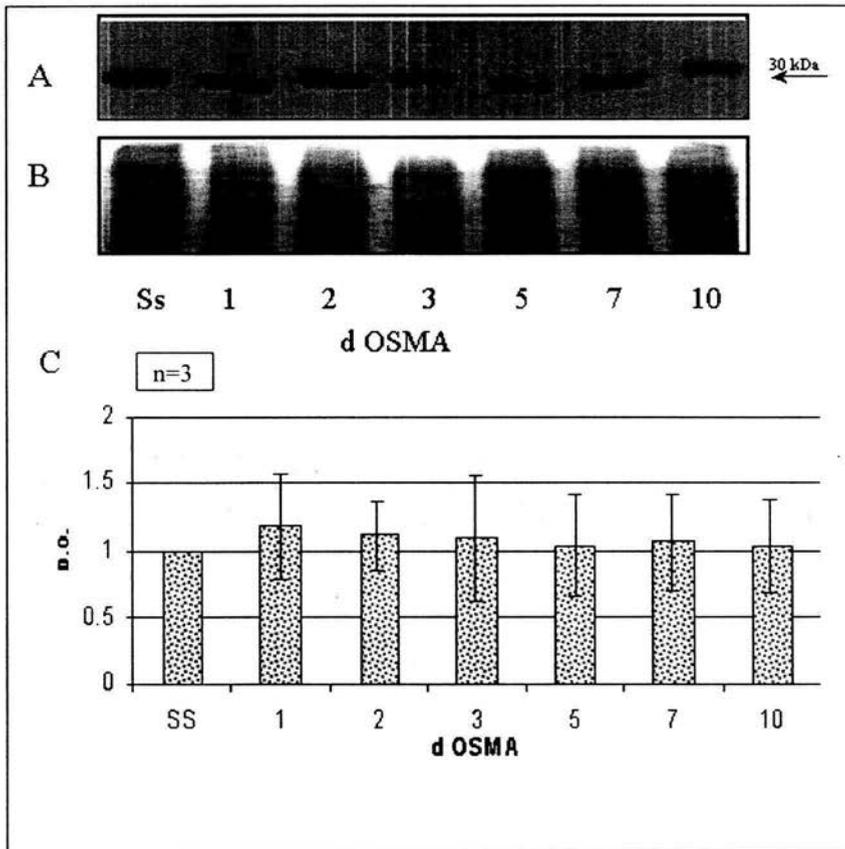


Fig. 3. Niveles de la proteína PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios disectados de semillas secas (SS) y osmoacondicionadas por los tiempos indicados. (A) Detección de PCNA, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

La Ciclina D2 se detectó como una proteína de alrededor de 38 kDa (Fig. 4), que mostró fluctuaciones importantes en las primeras 24 h de imbibición, con un

incremento hasta las 9 h y, a las 12 h fue evidente una caída drástica en la cantidad de ciclina D2; sin embargo a las 15 h los niveles se recuperaron detectándose incluso niveles de proteína más altos que a las 9 h. Posteriormente la cantidad de la proteína disminuyó gradualmente. Este patrón se obtuvo reproduciblemente en las réplicas del experimento.

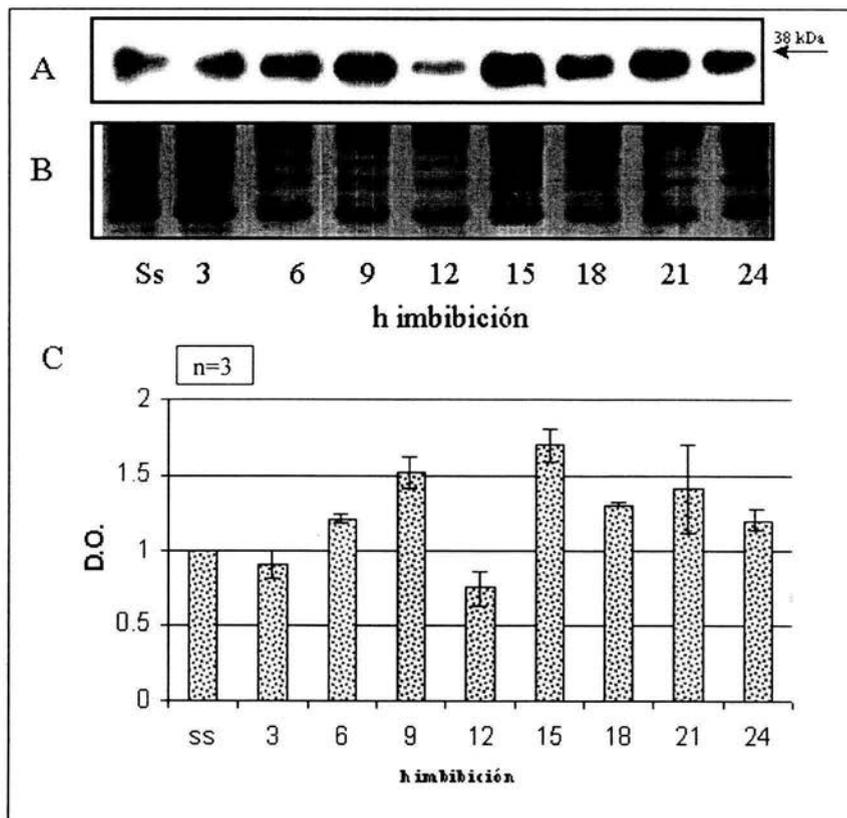


Fig. 4. Niveles de la proteína Ciclina D2 en ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS) y embebidas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas. (A) Detección de Ciclina D2, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

Cuando se detecta ciclina D2 en los extractos con distintos tiempos de OSMA, se observó que los niveles de esta proteína se mantienen relativamente constantes y solo se observó una disminución significativa en la señal de la muestra proveniente de ejes de semillas osmoacondicionadas por dos días (Fig. 5).

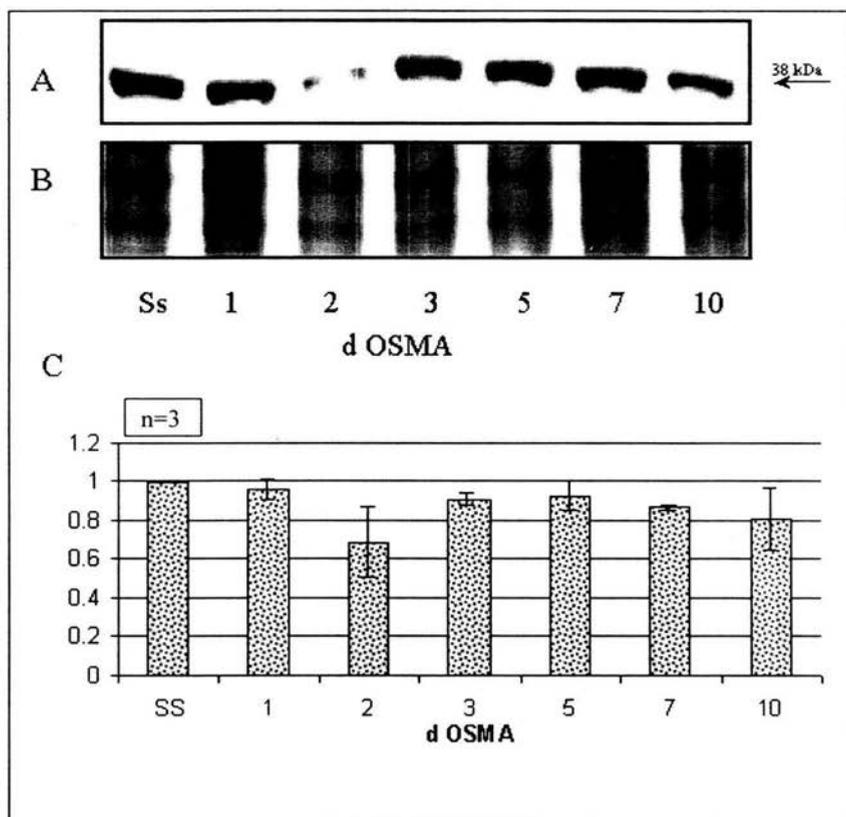


Fig. 5. Niveles de la proteína Ciclina D2 en extractos proteicos de ejes embrionarios disectados de semillas secas (SS) y osmoacondicionadas por los tiempos indicados. (A) Detección de PCNA, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

En el experimento para evaluar los cambios Cdk-A (Fig. 6), se observó una banda de 34 kDa que disminuye gradualmente hasta las 12 h y en tiempos posteriores la cantidad de la proteína se incrementa gradualmente.

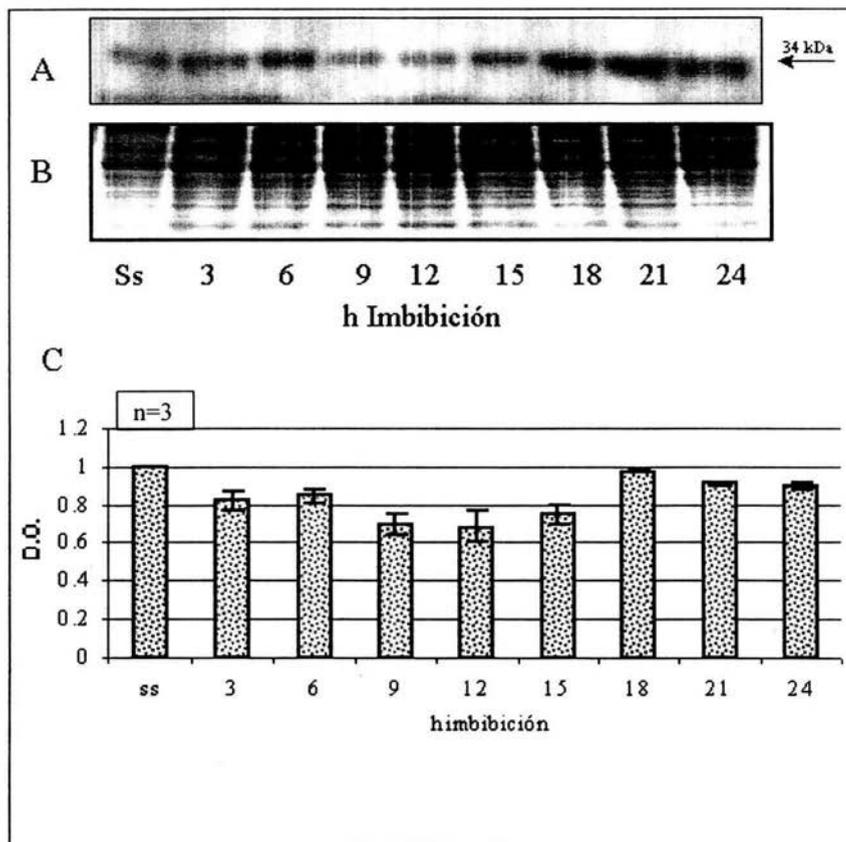


Fig. 6. Niveles de la proteína Cdk-A en ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS) y embebidas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas. (A) Detección de Cdk-A, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

El experimento para detectar a Cdk-A durante OSMA (Fig. 7). mostró que la cantidad de proteína permanece relativamente constante hasta por 7d y hacia los 10d disminuye la cantidad, aunque esto no es significativo.

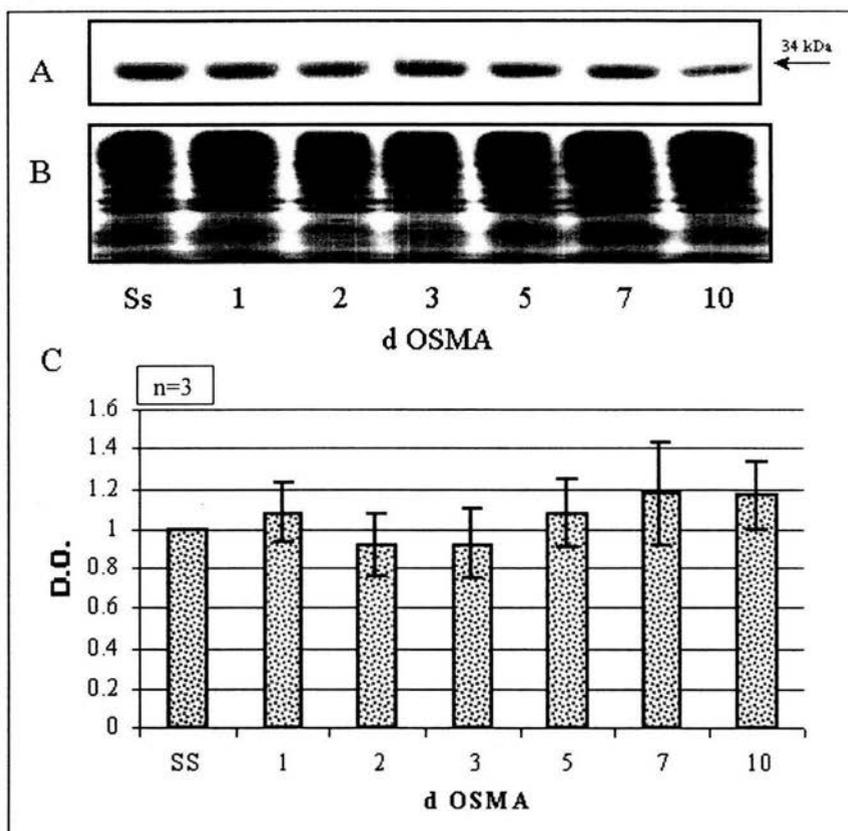


Fig. 7. Niveles de la proteína Cdk-A en extractos proteicos de ejes embrionarios disectados de semillas secas (SS) y osmoacondicionadas por los tiempos indicados. (A) Detección de Cdk-A, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y (C), Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

La DNA polimerasa  $\alpha$  fue detectada como una banda de 90 kDa, correspondiente a la subunidad catalítica. Los cambios fueron muy ligeros y no se encontraron diferencias

significativas entre los tiempos de imbibición (Fig. 8), patrón similar al encontrado por Coello et al., (1992).

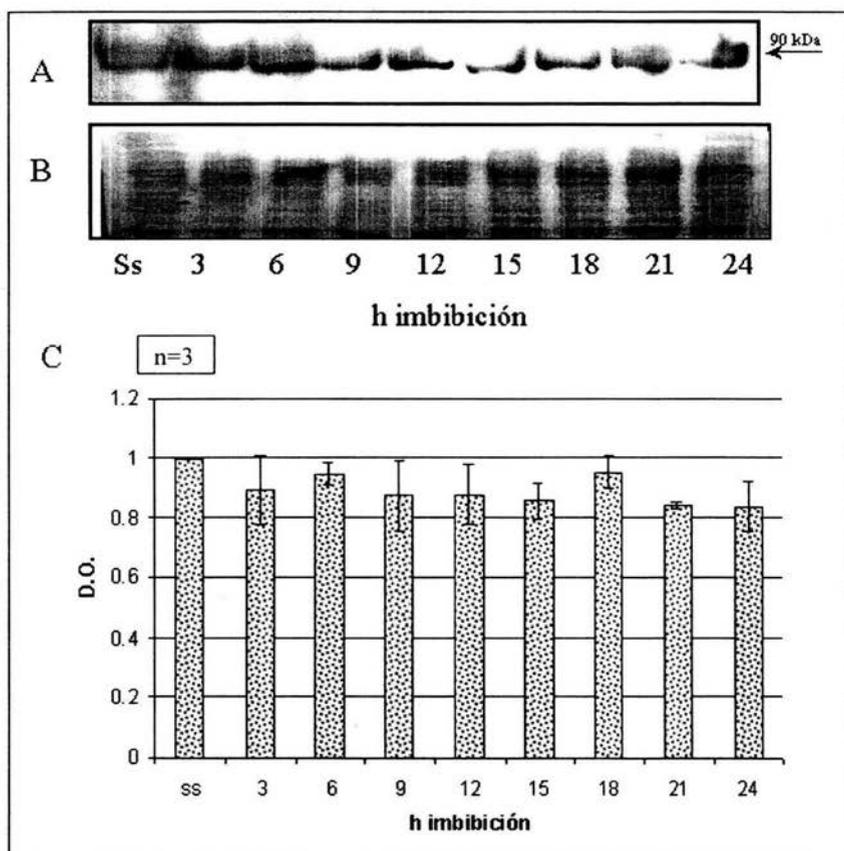


Fig. 8. Niveles de la proteína DNA polimerasa  $\alpha$  en ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS) y embebidas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas. (A) Detección de DNA polimerasa  $\alpha$ , (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

Por otro lado, el OSMA por periodos cortos, hasta por 3 días, provocó una disminución gradual en la cantidad de la DNA polimerasa  $\alpha$ ; solo cuando el tratamiento

duró 3 d la disminución fue significativa, cuando las semillas fueron osmoacondionadas por 5 días ó más la cantidad de proteína se recuperó (Fig. 9).

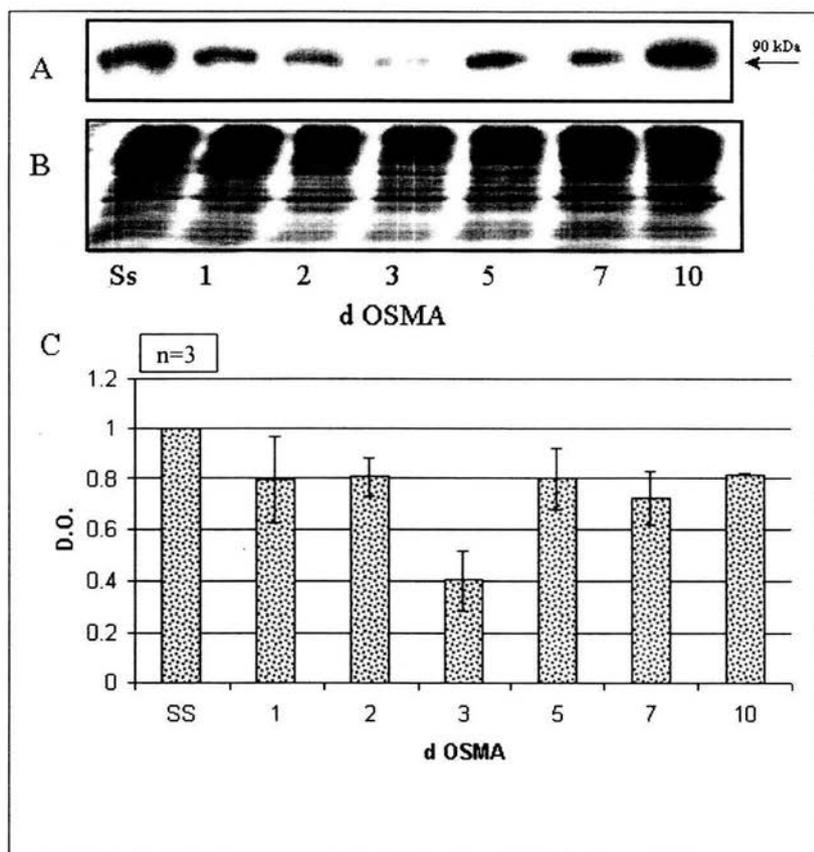


Fig. 9. Niveles de la proteína DNA polimerasa tipo  $\alpha$  en extractos proteicos de ejes embrionarios disectados de semillas secas (SS) y osmoacondionadas por los tiempos indicados. (A) Detección de DNA polimerasa  $\alpha$ , (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

## 6.2.2 Determinación de la actividad de DNA polimerasas total durante OSMA

Ya que se ha reportado que durante el OSMA ocurre síntesis de DNA, se evaluó la actividad total de DNA polimerasas en ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas esperando que durante el OSMA no se dieran cambios significativos. Inmediatamente después de la obtención del extracto crudo se midió la actividad de DNA polimerasas como se detalla en materiales y métodos; los resultados obtenidos se normalizaron con la concentración de proteína de cada muestra medida con la técnica de Bradford y los datos fueron graficados considerando el valor obtenido en semilla seca como 1 (Fig. 10). No se pudieron observar cambios significativos en la actividad presente tanto en semilla seca como semilla tratada por los distintos días de OSMA.

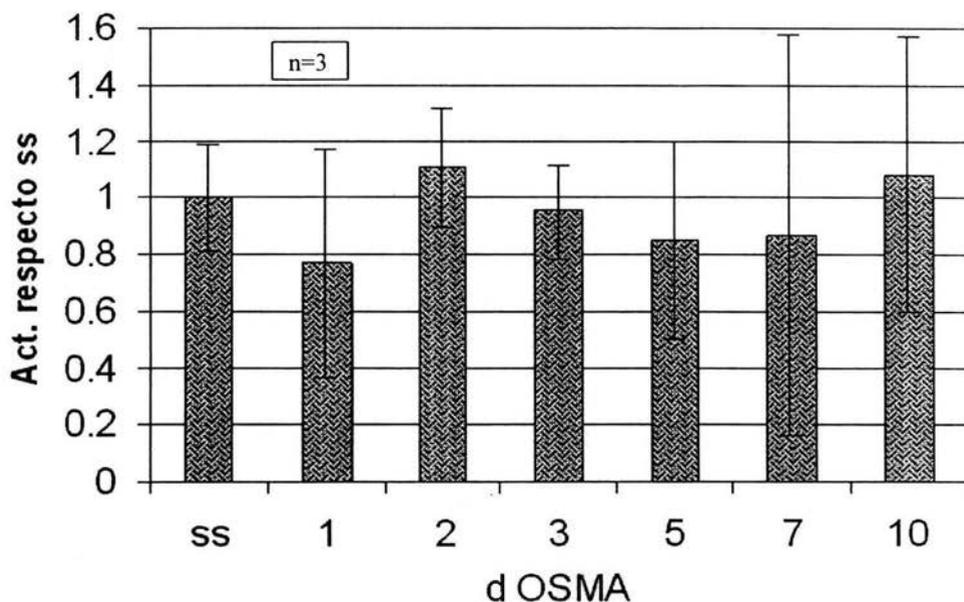


Fig. 10. Actividad de DNA polimerasa total en extractos de ejes embrionarios obtenidos de semillas secas (SS) y osmoacondicionadas por 1,2, 3, 5, 7 y 10 días

### **6.3 Germinación normal vs. Germinación post-osma.**

#### **6.3.1 Detección de los niveles de DNA polimerasa $\alpha$ , Cdk-A, Ciclina D y PCNA**

Para poder establecer si había diferencias ó no, tanto en la cantidad de proteína como en su comportamiento, cuando se embebían las semillas después del OSMA, se hizo la detección de las proteínas de interés empleando, por un lado, los extractos proteicos de ejes embrionarios que fueron embebidos por 6, 12, 18 y 24 horas, de ejes embrionarios de semilla seca y por otro lado se emplearon extractos de ejes embrionarios de semillas que se osmoacondicionaron por 10 d y después fueron embebidas en condiciones óptimas por 0, 3, 6 y 9 horas, ya que si el OSMA acelera los tiempos de germinación, de acuerdo a lo reportado anteriormente (Cruz-García et al.,1995), el período de 0-9 horas de germinación post-OSMA debería ser equivalente a 0-20 horas de germinación normal. Ya que la duración del OSMA no tuvo efectos significativos sobre la tasa de germinación, como se mostró en la figura 1, se decidió utilizar 10 días de OSMA en estos experimentos solo para asegurar que la protrusión radicular estuviera efectivamente inhibida en cada una de las repeticiones.

La comparación del comportamiento de PCNA entre las semillas tratadas y los lotes control, mostró el aumento gradual en la cantidad de proteína en las semillas control y, cuando las semillas fueron embebidas después del OSMA, también fue posible observar este incremento pero la acumulación fue mucho más rápida, tal que a las 6 h de imbibición post-OSMA se tuvieron niveles similares ó más altos que los detectados a las 18h de germinación normal, aunque a las 9 h la cantidad de proteína disminuyo(Fig. 11).

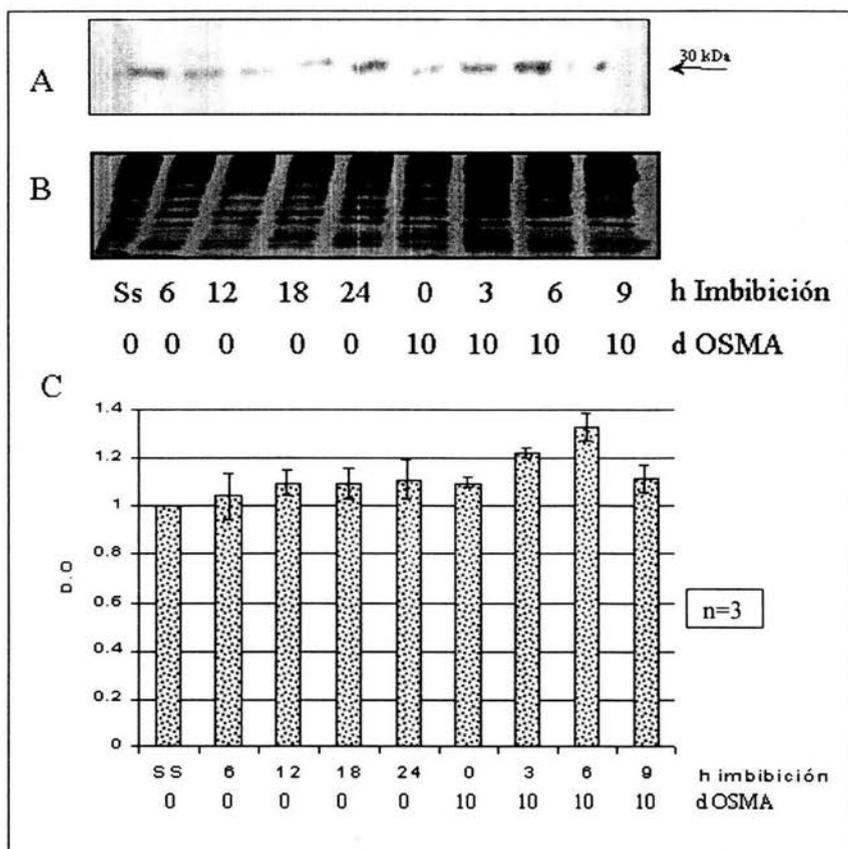


Fig. 11. Niveles de la proteína PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS), embebida por 6, 12, 18 y 24 h y de semillas con OSMA por 10 días y embebidas por 0, 3, 6, y 9 h. (A) Detección de PCNA, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

Con el anticuerpo contra ciclina D2 (Fig. 12) se observó en germinación post-OSMA un patrón oscilante en los niveles de la proteína, aunque los cambios observados no fueron significativos. Respecto a la cantidad de proteína, se observó un ligero aumento, en semillas con OSMA, pero este cambio no fue estadísticamente significativo.

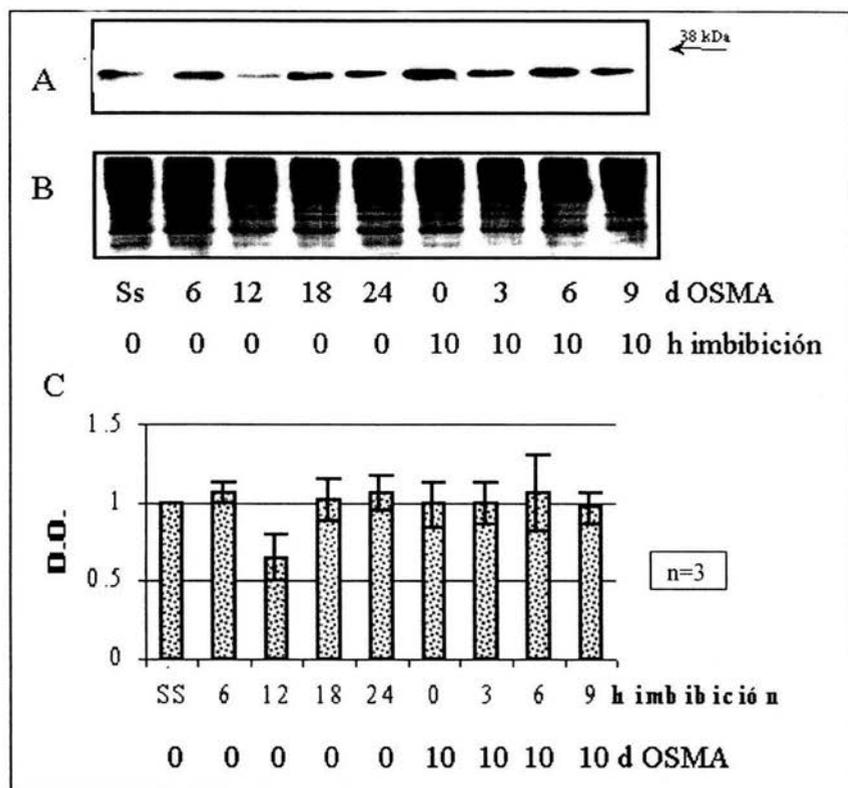


Fig. 12. . Niveles de la proteína Ciclina D2 en extractos proteicos de ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS), embebida por 6, 12, 18 y 24 h y de semillas con OSMA por 10 días y embebidas por 0, 3, 6, y 9 h. (A) Detección de Ciclina D2, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría.

Cuando se compararon los extractos de semillas embebidas normalmente con las que se osmoacondicionaron previamente para detectar Cdk-A, solo se observaron fluctuaciones ligeras, sin diferencias considerables, a excepción de los ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por 10 días y embebidas posteriormente por 9 horas, donde se observó una disminución que no fue estadísticamente significativa (fig. 13).

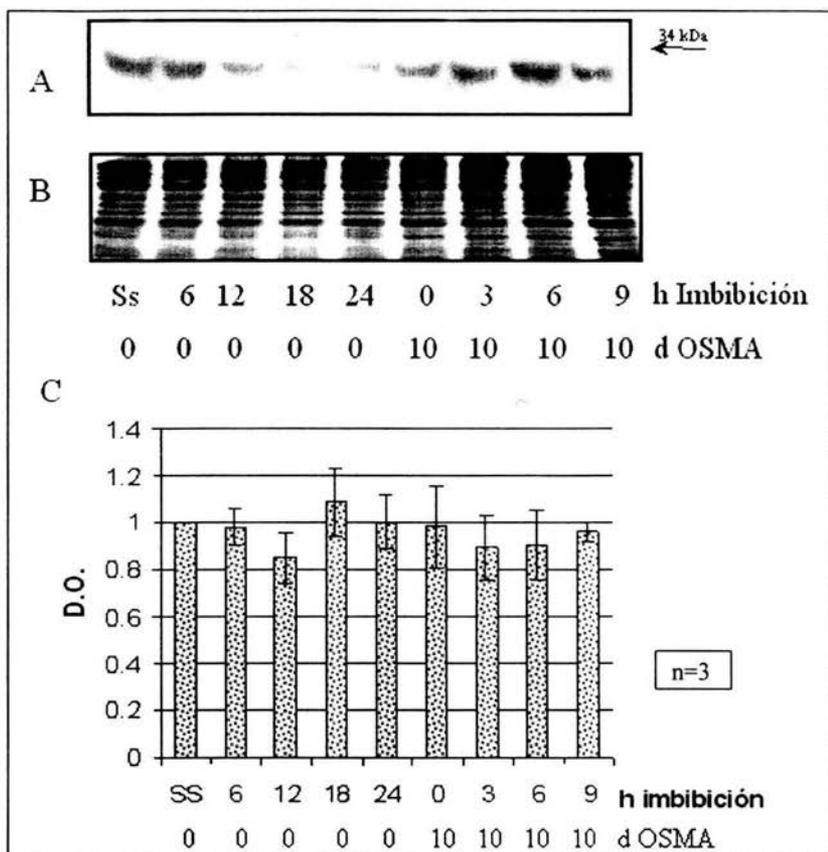


Fig. 13. Niveles de la proteína Cdk-A en extractos proteicos de ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS), embebida por 6, 12, 18 y 24 h y de semillas con OSMA por 10 días y embebidas por 0, 3, 6, y 9 h.

(A) Detección de Cdk-A, (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y, (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría

Con el anticuerpo contra DNA polimerasa  $\alpha$  (Fig. 14), se pudo ver que la cantidad de proteína que se detecta durante imbibición post-OSMA mostró cambios muy ligeros, que no fueron significativos, de un modo similar al que se da en semillas germinadas normalmente, aunque si se observó una tendencia a aumentar.

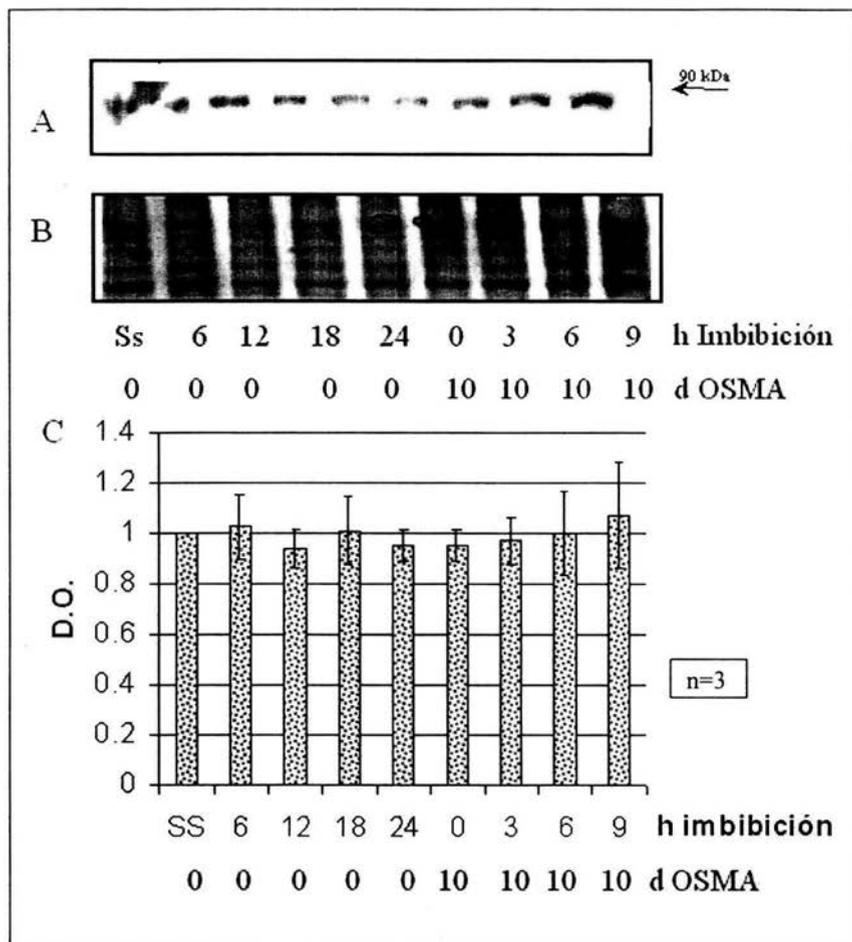


Fig. 14. . Niveles de la proteína DNA polimerasa  $\alpha$  en extractos proteicos de ejes embrionarios de semillas de maíz secas (SS), embebida por 6, 12, 18 y 24 h y de semillas con OSMA por 10 días y embebidas por 0, 3, 6, y 9 h. (A) Detección de DNA polimerasa  $\alpha$ , (B) Proteínas teñidas con reactivo de Bradford y (C) Gráfico obtenido a partir del análisis de densitometría

### 6.3.2 Determinación de la actividad de polimerasas $\alpha$ y $\delta$ .

Dado que los datos obtenidos anteriormente en el laboratorio permiten sugerir que el OSMA provoca que en la germinación subsecuente de las semillas de maíz las células entren de un modo más rápido a la fase S, respecto a las semillas embebidas normalmente, se decidió seguir el comportamiento de las DNA polimerasas. En este caso el extracto crudo se sometió a una cromatografía de intercambio iónico para obtener las actividades correspondientes a DNA polimerasas tipo  $\alpha$  y  $\delta$ , pues gracias al trabajo de Coello et al., (1992) se sabe que cuando un extracto proteico de semillas de maíz se pasa a través de una columna de DEAE-Sepharosa y posteriormente se eluye con un buffer de fosfatos 40 mM, la actividad detectada en las fracciones obtenidas corresponderá a una DNA polimerasa tipo  $\delta$ ; de acuerdo a la caracterización realizada en nuestro grupo de trabajo, si posteriormente se eluye utilizando un buffer de fosfatos 400 mM, las fracciones estarán enriquecidas con una actividad de polimerasas correspondiente a una DNA polimerasa tipo  $\alpha$ . Con estos experimentos se podría determinar que tipo de actividad de DNA polimerasa era la dominante durante el OSMA y en la imbibición posterior. Los datos obtenidos se normalizaron empleando la concentración de proteína medida con el método de Bradford y se ajustaron considerando el valor obtenido en semilla seca como 1.

Los experimentos se hicieron 3 veces partiendo de lotes de semillas independientes; se obtuvo una gran variabilidad entre cada experimento pero los datos mostrados son representativos de las conductas observadas.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos con las fracciones que corresponderían a la DNA polimerasa tipo  $\alpha$ . Se puede ver que a las 12 horas de imbibición

no hay un cambio significativo en la actividad de DNA polimerasas comparado con el control. En semillas osmoacondicionadas por 1 y 10 días la actividad de la DNA polimerasa tipo  $\alpha$  aumentó en alrededor de un 60% con respecto a la semilla seca; cuando se utilizaron fracciones provenientes de ejes embrionarios que fueron osmoacondicionados por 10 días y germinados por 3 horas, se observó un aumento de 2.5 veces respecto a la actividad de la semilla seca y de casi el doble si se compara con la actividad de las semillas osmoacondicionadas y procesadas inmediatamente; los tiempos de imbibición posteriores, no mostraron diferencias significativas.

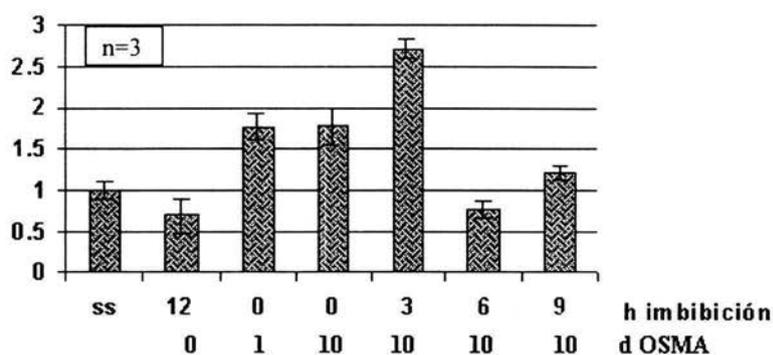


Fig. 15. Actividad de DNA polimerasas en fracciones eluidas de una columna de DEAE-Sepharosa con buffer de fosfatos 400 mM, correspondientes a una DNA polimerasa tipo  $\alpha$ . Los extractos fueron obtenidos de semillas secas (SS), embebidas por 12 horas, osmoacondicionadas por 1 día, por 10 días y germinadas después del tratamiento por 3, 6 y 9 horas

En la fig. 16 se muestran los resultados obtenidos con las fracciones que corresponderían a la DNA polimerasa tipo  $\delta$ . La imbibición por 12 horas en condiciones óptimas de humedad de las semillas provocó la disminución de la actividad, aunque como en el caso de la DNA polimerasa  $\alpha$ , esta disminución no fue significativa de acuerdo a las

desviaciones estandar obtenidas. Las semillas osmoacondicionadas por 1 día mostraron un aumento de casi 3 veces si se compara con la actividad encontrada en semilla seca; pero cuando se evaluaron semillas osmoacondicionadas por 10 días la actividad no se modificó, lo cual significó una actividad 3 veces menor a lo que se registró con un día de osmoacondicionamiento. La germinación post-OSMA de las semillas tratadas 10 días mostró una tendencia a disminuir conforme avanzó la imbibición aunque estadísticamente no es significativo.

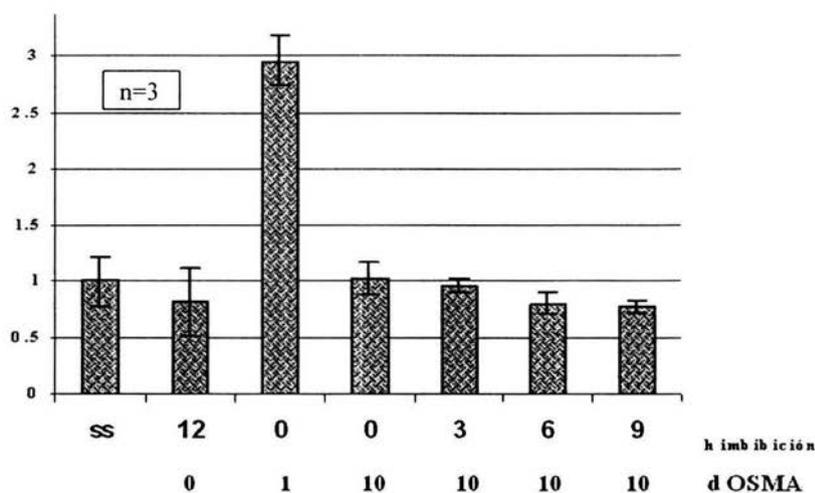
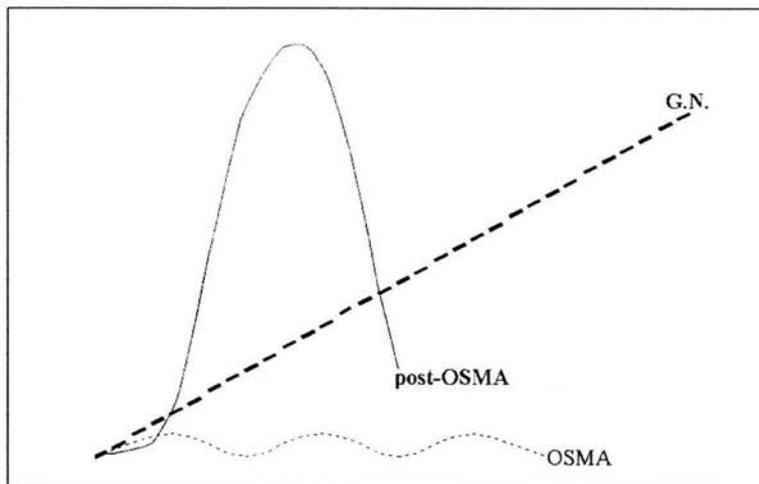


Fig. 16. Actividad de DNA polimerasas en fracciones eluidas de una columna de DEAE-Sepharosa con buffer de fosfatos 40 mM, correspondientes a una DNA polimerasa tipo  $\delta$ . Los extractos fueron obtenidos de semillas secas (SS), embebidas por 12 horas, osmoacondicionadas por 1 día, por 10 días y germinadas después del tratamiento por 3, 6 y 9 horas.

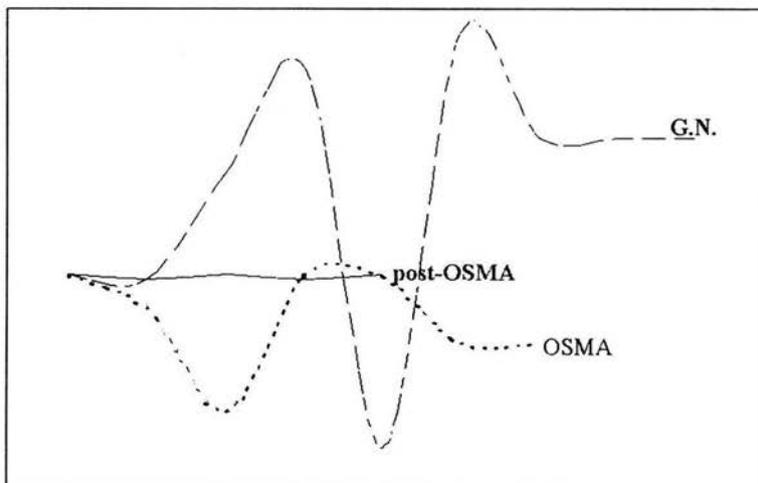
#### 6.4 Síntesis de conductas obtenidas en los experimentos de inmunorreconocimiento.

A continuación se muestran los gráficos que sintetizan el comportamiento observado en los distintos tratamientos con las proteínas empleadas:

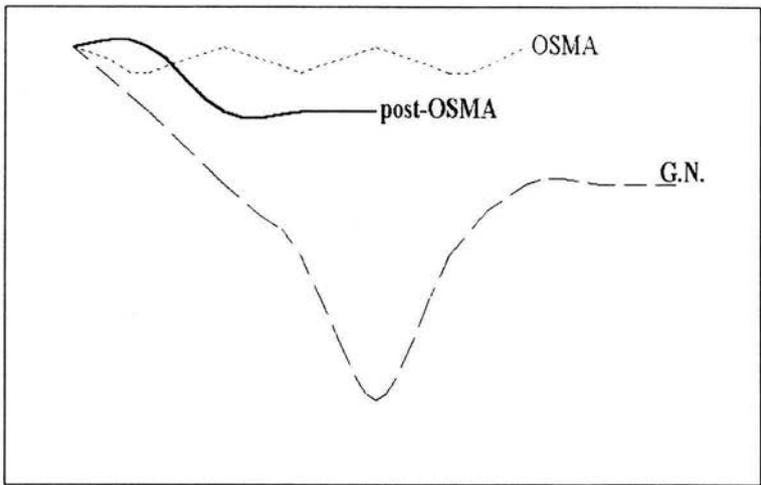
PCNA



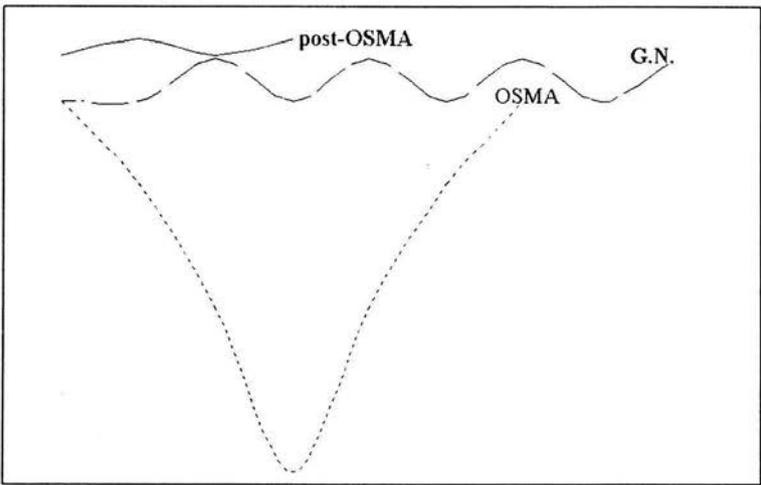
Cic D



Cdk-A



DNA polimerasa  $\alpha$



## VII. DISCUSIÓN

La finalidad de este proyecto fue caracterizar el comportamiento de proteínas marcadoras de la transición G1/S del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz durante el proceso de OSMA, durante la germinación posterior al tratamiento, al finalizar el OSMA y cuando la semilla se embebe en condiciones óptimas. Esto servirá para caracterizar la fase del ciclo celular en que se encuentran las células del eje embrionario al finalizar el OSMA y determinar si dicho tratamiento efectivamente permite que las células avancen dentro de la fase G1 del ciclo celular pero no pueden pasar a la fase S y por lo tanto, pueda ser empleado como una estrategia para “sincronizar” las células del eje embrionario; así el OSMA podría ser empleado como un modelo para hacer estudios sobre aspectos del ciclo celular y su papel dentro del proceso de la germinación.

El primer paso fue establecer el porcentaje de viabilidad inicial de las semillas que se emplearon y determinar si el procedimiento que se reportó para semillas de maíz (Cruz-García et al., 1995) proveía a las semillas de los beneficios del OSMA. Para esto se osmoacondicionaron semillas por distintos tiempos y posteriormente se pusieron a germinar. Durante el tratamiento no se observó protrusión radicular y los datos obtenidos durante la germinación posterior (Fig. 1) muestran cómo las semillas tratadas completaron la germinación más rápidamente, alrededor de 8 horas antes que las semillas control; además, el osmoacondicionamiento provocó que el 50% de la germinación se alcanzara de 14 a 18 horas antes que en el control y que el porcentaje final de germinación también se incrementara de un 80% que fue el valor obtenido después de 50 horas de imbibición a un valor mayor a 90% para los lotes osmoacondicionados. Estos resultados permitieron determinar que el osmoacondicionamiento efectivamente estaba beneficiando a las

semillas, beneficios que pudieron ser observables en la germinación subsecuente, tal como fue reportado por Cruz-García (1995) para semillas de maíz y como ha sido reportado para especies como frijol (Sánchez-Jiménez et al., 1997), jitomate (Özbingol et al., 1998), lechuga (Tarquis y Bradford, 1992), chile (Lanteri et al., 1993), girasol (Chojnowsky et al., 1997), y otras.

Es interesante el hecho de que el incremento en la duración del tratamiento correlacionó con una tendencia a la disminución del porcentaje final de germinación, aunque las diferencias entre los tiempos de OSMA no fueron significativas, en semillas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) se han documentado efectos adversos atribuidos a tiempos de OSMA prolongados; el OSMA por 2 días provoca que a los 10 días de imbibición post-OSMA se obtuviera el 40% de germinación, mientras que, cuando el tratamiento dura solo 2 días en el mismo tiempo de imbibición (10 días) el 85% de las semillas habían germinado (Capron et al., 2000).

Una vez que se comprobó la eficacia del tratamiento, se determinó si evaluando los niveles de proteínas del ciclo celular se podía establecer en qué punto se encontraban las células del eje embrionario durante el osmoacondicionamiento y si durante la germinación post-OSMA la fase S se adelantaba. Los marcadores empleados de G1/S fueron PCNA, CicD, Cdk-A y los de la fase S, las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$ . Para cubrir este objetivo se hicieron experimentos tipo Western blot en los que se emplearon extractos proteicos obtenidos a partir de ejes embrionarios de semillas embebidas en condiciones normales, ó bien osmoacondicionadas por 10 días y embebidas posteriormente.

Cruz-García et al. (1995), habían reportado que en ejes embrionarios sometidos a osmoacondicionamiento la entrada a la fase S, de acuerdo a los niveles de incorporación de

timidina tritiada, ocurre entre las 3 y las 6 horas. En base a este reporte se puede seguir el comportamiento de proteínas del ciclo celular cuando las células del eje embrionario se encuentran por entrar a la fase S.

Durante la germinación ya se había mostrado que PCNA, cuyo papel en la replicación del DNA ha sido bien documentada como plataforma de anclaje para la DNA polimerasa  $\delta$  (Tsurimoto, 1998), se acumulaba conforme avanzaba el tiempo de imbibición de las semillas, encontrándose el máximo después de 18 horas de imbibición (Herrera et al., 2000); esta acumulación se ha asociado al requerimiento de PCNA que tienen las células para que progrese a la fase S. Esta conducta también fue obtenida en este trabajo (Fig. 2), y cuando el experimento se hizo utilizando semillas osmoacondicionadas por distintos tiempos (Fig.3) solo se observaron ligeras fluctuaciones, que aunque no fueron significativas, podrían estar sugiriendo el recambio de PCNA; lo anterior ha sido propuesto por Herrera et al. (2000), quienes observaron que cuando ejes embrionarios de maíz son embebidos en presencia de cicloheximida, que interfiere con la síntesis de proteínas, PCNA desaparece gradualmente. A partir de este experimento se propuso que la presencia y acumulación de esta proteína durante la germinación se debe a síntesis de novo. Dado que se ha propuesto que los procesos que ocurren durante el OSMA son similares en gran medida a lo que ocurre durante las primeras horas de la imbibición normal, también se esperaría recambio de PCNA durante OSMA, aunque las células del eje embrionario no llegan al punto en que se da la señal que permite la acumulación de esta proteína.

Por otro lado, ya se habían obtenido datos acerca de la síntesis de DNA durante OSMA. En presencia de timidina marcada radiactivamente, se había encontrado incorporación de radiactividad a niveles muy bajos en citoplasma y núcleo, pero una vez

liberadas las células del estrés osmótico la incorporación de marca en el núcleo se elevaba notablemente (Cruz –García et al., 1995). La entrada a la fase S en ejes embrionarios de semillas germinadas post-OSMA, se daba entre las 4 y 6 horas. Estos experimentos también permitieron suponer que si PCNA es indispensable para que la síntesis de DNA se lleve a cabo de manera eficiente, entonces debía acumularse rápidamente en germinación post-OSMA. Esto se hizo evidente en este trabajo al observar la acumulación de PCNA a las 6 horas de imbibición post-OSMA a niveles semejantes a los detectados a las 18 horas de imbibición de semillas control (fig. 11).

Estos resultados sugieren fuertemente que, efectivamente, durante el OSMA ocurren cambios moleculares en las células del eje embrionario que, aunque no permiten la acumulación de PCNA, sí permiten su rápida acumulación post-OSMA, siendo éste uno de los factores que muy posiblemente contribuya a la entrada, en tiempos más tempranos, a la fase S.

Hasta ahora no se han establecido las condiciones para osmocondicionar ejes embrionarios aunque sería interesante establecer las condiciones apropiadas, en lugar de trabajar con la semilla completa y de este modo poder exponer los ejes a cicloheximida y observar si existe recambio de PCNA, lo que quizá indicaría que es un PCNA sintetizado de novo el que es importante para la germinación. Por otro lado, las semillas durante el OSMA podrían ser un modelo interesante para evaluar la importancia de la degradación de proteínas durante un proceso de desarrollo.

Las ciclinas D son un grupo de proteínas que en sistemas animales se ha visto que participan en la transición G1/S, asociándose a una cdk; este complejo es capaz de fosforilar a la proteína Rb que entonces libera a E2F-DP (Adams, et al., 2001). Induciéndose la producción de muchas proteínas que conducirán la síntesis de DNA. En el

caso de plantas se han detectado una gran cantidad de ciclinas tipo D; por ejemplo, en *Arabidopsis* se han encontrado 10 secuencias que pueden corresponder a esta familia, aunque el papel de cada una de estas proteínas en el desarrollo de la planta queda por establecerse. En el laboratorio recientemente se obtuvieron anticuerpos dirigidos contra un fragmento de una ciclina tipo D2 (Gutiérrez-Aguilar, 2004). Es notable la disminución de esta proteína a las 12 horas, tiempo en el que la primera población de células del eje embrionario estaría entrando a la fase S (Baiza et al., 1989); posteriormente, a las 15 horas de imbibición, los niveles de proteína se recuperan y tiende a disminuir gradualmente (Fig. 4); este cambio es poco probable que corresponda a una segunda ronda de síntesis de DNA, al menos no de la misma población de células, pero podría corresponder a un segundo grupo de células que inicien la síntesis de DNA, como ya ha sido sugerido por Georgieva et al. (1994). Por otro lado, es necesario hacer notar que aunque en sistemas animales y en levaduras se ha mostrado la aparición y desaparición cíclica de estas proteínas (Sherr y Roberts, 1991). En plantas este patrón no es evidente, por lo que el comportamiento detectado ahora podría estar dando indicios de mecanismos regulatorios distintos a los que se han observado en otros tejidos, que son particulares a la germinación. En semillas osmoacondicionadas no se observaron cambios en la cantidad de proteína cuando el tratamiento duró hasta 10 días, a excepción de la muestra de 2 días de osmoacondicionamiento, donde se observa una caída (Fig. 5). Ya que se sabe que la inhibición de la síntesis de proteínas en semillas embebidas en condiciones óptimas provoca que la cantidad de una Ciclina D detectada con un anticuerpo heterólogo disminuya conforme avanza el tiempo de imbibición (Cruz-García et al., 1998), sería interesante determinar si durante OSMA, en el caso de esta ciclina D se pueda estar dando este recambio, semejante al de PCNA, por lo que podría pensarse que el estado metabólico

que significa OSMA no permita ni degradación ni acumulación de ciclina D, lo que quizá impediría a las células entrar a la fase S. Por otro lado, si esto es cierto entonces durante la germinación post-OSMA debía observarse un cambio en la conducta ó en la cantidad de la proteína respecto a la germinación normal. Efectivamente, a las 3 horas de imbibición post-OSMA la proteína disminuyó notablemente en contraste al aumento gradual que se dio hasta las 9 horas de imbibición en condiciones normales, lo cual podría estar sugiriendo que si bien durante el osmoacondicionamiento no hubo cambios a nivel de proteína, las células debieron haber sufrido cambios que permitieron que en germinación post-OSMA la ciclina D2 se degradara lo que indicaría que cubrió su función de G1 durante OSMA. El aumento de ciclina D2 a las 6 horas de imbibición post-OSMA podría estar asociado, como en el caso de la germinación normal, a una segunda población celular que está entrando a la fase S (Fig. 12).

Como ya se mencionó anteriormente, las Cdks son proteínas que pueden fosforilar sustratos específicos gracias a su unión a una ciclina; en el caso de la transición G1/S se ha visto que es una Cdc 2 la que se asocia a la ciclina para fosforilar a Rb (Adams, 2001). De distintas especies de plantas como *Arabidopsis*, arroz y pino (Mironov et al., 1999) y maíz (Colasanti et al., 1991) se han podido aislar los homólogos a Cdc2, denominadas Cdk-A. En el laboratorio se han obtenido anticuerpos contra Cdk-A (Orjuela-Henry, datos no publicados), los cuales fueron utilizados para rastrear el efecto del osmoacondicionamiento sobre esta proteína. En primer lugar era necesario observar la conducta de Cdk-A en condiciones normales de germinación (Fig. 6); contrario a lo que se ha reportado en otras especies de plantas (Dewitte y Murray, 2003), se observó que la cantidad de proteína disminuyó conforme avanzó la germinación, y aunque el tiempo en que se observó la disminución correlaciona con el tiempo en que la primera población de células se encuentra

en la fase S, lo que podría estar sugiriendo la regulación de la actividad de la proteína mediante degradación, será necesario establecer el tiempo en que esta proteína se encuentra asociada a alguna ciclina que le confiera actividad. En vista del comportamiento obtenido en condiciones normales, el que la proteína no muestre cambios significativos durante el OSMA (Fig. 7) no puede decir nada acerca del estado del ciclo celular en el que se encuentran las células durante el tratamiento. Sin embargo, como ya se ha mencionado, los efectos del osmoacondicionamiento son más evidentes en la germinación posterior. No obstante, los niveles de proteínas mostraron una tendencia a disminuir en las semillas osmoacondicionadas y germinadas por 3 y 6 horas respecto a lo detectado en germinación normal (Fig. 13). Si este cambio posee algún significado en la germinación posterior ó en el adelanto de la fase S estaría por demostrarse, pues aunque la cantidad de proteína es estable, Sánchez et al. (2002) han mostrado que la actividad de cinasa correspondiente a una Cdk tipo A aumenta conforme avanza la imbibición, por lo que sería necesario establecer si durante el OSMA, Cdk-A se encuentra asociada y/o activa ó bien, en que momento de la germinación posterior se activa.

Otro de los tópicos de interés para este grupo de trabajo ha sido la replicación del DNA durante la germinación y particularmente se ha estudiado el comportamiento de las DNA polimerasas tipo  $\alpha$  y  $\delta$ , por lo que se siguió la actividad de ambas durante el OSMA, esperando que pudieran indicar si las células del eje embrionario entraban a fase S. Así mismo, dado que se dispone de un anticuerpo dirigido contra la DNA polimerasa  $\alpha$ , se decidió observar si había algún efecto sobre los niveles de esta proteína en semillas osmoacondicionadas.

Anteriormente, Coello y Vázquez-Ramos (1992) establecieron que en germinación normal la cantidad de DNA polimerasa  $\alpha$  no variaba, pero su actividad sí se incrementaba considerablemente conforme avanzaba el proceso de germinación. En este trabajo, durante la germinación normal (Fig. 8) se observaron algunas fluctuaciones en la cantidad de la proteína, aunque estas no fueron significativas, como ya había sido reportado por Coello y Vázquez-Ramos (1995). El OSMA (Fig. 9) provocó que la DNA polimerasa  $\alpha$  disminuyera gradualmente cuando el tratamiento duró hasta 3 días y en tiempos posteriores la cantidad de proteína aumentó, mostrando que hay recambio durante los primeros días de OSMA. Si este recambio es necesario para el avance del ciclo celular en las células del eje embrionario durante la germinación, entonces el avance en este proceso podría ser parte de los beneficios otorgados por el OSMA, aunque en la germinación posterior no se observen cambios importantes.

Respecto a la actividad, se ha reportado anteriormente que durante el proceso germinativo la actividad de la DNA polimerasa  $\alpha$  aumenta varias veces respecto a los valores detectados en semilla seca (García, et al. 1997), además de que la actividad puede ser estimulada si los ejes se embeben en presencia de citocininas (Gómez-Roig y Vázquez-Ramos, 2003), por lo que se esperaba que durante el OSMA la actividad no aumentara de manera significativa y que, durante germinación post-OSMA, la actividad aumentara rápidamente. Los resultados obtenidos (Fig. 15 y 16) mostraron una gran fluctuación y, contrario a lo que se había observado anteriormente, particularmente en el caso de la DNA polimerasa  $\alpha$ , la actividad disminuyó cuando las semillas se embebieron, por lo en este momento no se puede saber si las conductas observadas en estos experimentos reflejan cambios fisiológicos dados en las semillas por el OSMA.

Con los resultados obtenidos con los marcadores de ciclo celular utilizados, podemos determinar que únicamente el comportamiento de PCNA es consistente con la idea de que las células del eje embrionario se detienen previo a la fase S durante el tratamiento de OSMA. Ya que las fluctuaciones en la cantidad de Ciclina D y de Cdk-A no aportan evidencias claras de este tipo y que los cambios que están ocurriendo durante OSMA y en la germinación subsecuente. Será necesario hacer experimentos que lleven a establecer el momento en que el complejo Ciclina/Cdk, posea actividad de cinasa que pueda estar involucrada en el avance del ciclo celular, para saber si es a este nivel que se da la regulación de la transición G1-S durante la germinación.

## VIII. CONCLUSIONES.

- El OSMA de semillas de maíz permitió que éstas germinaran más rápida y uniformemente respecto al control. El OSMA también provocó que el porcentaje de germinación se incrementara significativamente.
  
- Durante el OSMA de semillas de maíz la cantidad de PCNA se mantuvo constante; en la germinación post-OSMA se observó una correlación entre el tiempo en que se da la acumulación de PCNA y el tiempo en que las células de los ejes embrionarios previamente osmoacondicionados entran a la fase S. además, se acumuló rápidamente una vez que las condiciones de humedad fueron óptimas.
  
- Cdk-A se mantuvo constante en todas las condiciones observadas, a excepción de la imbibición post-OSMA donde se observó una tendencia a la disminución de la proteína.
  
- La cantidad de Ciclina D2 no cambió durante el OSMA, excepto cuando el tratamiento duró 2 días donde disminuyó de manera muy importante. Durante germinación post-OSMA se observaron fluctuaciones que pudieran estar asociadas a cambios en la fase del ciclo celular de las células del eje embrionario.

- La DNA polimerasa  $\alpha$  parece sufrir un proceso de degradación y resíntesis durante OSMA; durante la germinación posterior al tratamiento no se observaron cambios en la cantidad de proteína.
  
- La actividad de las DNA polimerasas presenta fluctuaciones durante la germinación post-OSMA, aunque por el momento es difícil saber si estas tienen algún significado fisiológico.

## IX. PERSPECTIVAS

Ya que una de las líneas de investigación dentro de este grupo de trabajo es la caracterización del OSMA, con la finalidad de poder emplearlo como una estrategia para estudiar la transición G1/S, y dados los resultados obtenidos en este trabajo, se propone:

- Establecer las condiciones óptimas para medir la actividad de DNA polimerasas, para poder saber cual es el efecto del OSMA durante la germinación post-OSMA.
- Evaluar, si durante el OSMA se da la formación del complejo Ciclina/Cdk y si este posee actividad de cinasa.
- También será necesario comparar el comportamiento tanto del complejo, como de su actividad durante la germinación post-OSMA.
- Otro aspecto interesante sería saber, cuál es el efecto del deterioro sobre el avance del ciclo celular durante la germinación y si se dan cambios cuando las semillas son osmoacondicionadas.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Adams, P. D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochem. Biophys. Acta.* 1471: M123-M133.
- Alvarado A. D. y Bradford, K. J. 1988. Priming and storage of tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) seeds I. Effect of storage temperature on germination rate and viability. *Seed Sci. Tech.* 16: 601-612.
- Baiza, A. M., Vázquez-Ramos, J. y Sánchez de Jiménez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 426-431.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, y F., Côme, D. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Sci. Res.* 10: 35-42.
- Bewley, J. D., y Black, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination.* Plenum Press. New York. pag. 445.
- Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* 9:1055-1066.
- Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under estrés conditions. *HortScience.* 59: 672-676.
- Bradford, K. J. 1995. Water relations in seed germination. p.p. 351-396 en Kigel, J. and Galili, G. (Eds). *Seed development and germination.* New York. Marcel Dekker.
- Bray, C. M. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. p.p. 351-396 en Kigel, J. and Galili, G. (Eds). *Seed development and germination.* New York. Marcel Dekker.

- Bonnioti, M. B. y Gutiérrez, C. 2001. A cell cycle regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a Cdk-A/Cyclin D complex. *Plant J.* 28: 341-350.
- Campos-Alvárez, F., Cruz-García, F., Torres-Espinosa, A., Sánchez-Jiménez, M., Colmenero-Flores, J. M., Smith-Espinoza, C., Covarrubias-Robles, A. A. y Vázquez-Ramos, J. M. 2002. Expresión de genes codificantes para proteína abundantes en embriogénesis tardía (LEA), durante el osmoacondicionamiento de semillas de maíz y frijol. *Agrociencia.* 36: 461-470.
- Capron, I., Corbineau, F., Dacher, F., Job, C., Côme, D. y Job, D. 2000. Sugarbeet seed priming; effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of LEA proteins. *Seed Sci. Res.* 10- 243-254.
- Clarke, N. A. y James, P. E. 1991. The effects of priming and accelerated ageing upon the nucleic acid content of leek seeds and their embryos. *J. Exp. Bot.* 42: 261:268.
- Chojnowsky, M., Corbineau, F. y Côme, D. 1997. Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. *Seed Sci. Res.* 7: 323-331.
- Coello, P., Rodríguez, R., García, E. y Vázquez-Ramos, J. M. 1992. A DNA polymerase from maize axes : its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.* 20: 1159-1168.
- Coello, P. y Vázquez-Ramos, J. M. 1995. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* 231: 99-103.

- Coolbear, P. y Grierson, D. 1979. studies on the changes in the major nucleic acid components of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.) resulting from osmotic presowing treatment. *J. Exp. Bot.* 30: 1153-1162.
- Colasanti, J., Tyers, M. y Sundaresan, V. 1991. Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3377-3381.
- Cruz-García, F., Jiménez L. F. y Vázquez-Ramos, J. M. 1995. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. *Seed Sci. Res.* 5: 15-23.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J. J. y Vázquez-Ramos, J. M. 1998. Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 102: 573-581.
- de Castro, R. D., van Lammeren, A. A. M., Groot, S. P. C., Bino, R. J. y Hilhorst, H. W. M. 2000. cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic estrés but DNA synthesis and formation of microtubular cytoeskeleton are not. *Plant Physiol.* 122: 327-335.
- Dell'Aquila, A. y Spada, P. 1992. Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. *Seed Sci. Res.* 2: 75-80.
- Deltour, R. y Jaqmard, M. 1974. Relation between water estrés and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Ann. Bot.* 38: 329-334.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L. y Terras, F. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 13: 1653-1668
- Dewitte, W. y Murray, J. A. H. 2003. The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:235-264.

- Egelkrou, E. M., Mariconti, L., Settlege S. B., Cella, R., Robertson, D. y Hanley-Bowdoin, L. 2002. Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell*. 14:3225-3236.
- Fujikura, Y. y Karssen, C M. 1995. Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour-related protein and osmopriming-enhanced expression of putative aspartic protease. *Seed Sci. Res.* 5: 177-181.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. y Job, D. 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126: 835-848.
- Gao, Y., Young, L., Bonham-Smith, P. y Gusta, L. V. 1999. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under estrés conditions. *Plant Mol. Biol.* 40: 635-644.
- García, E., Orjuela, D., Camacho, Y., Zúñiga, J. J., Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J M. 1997. Comparison among DNA polymerases 1, 2 ,and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.* 33: 445-455.
- Georgieva, E. I., López-Rodas, G. y Loidl, P. 1994. Maize embryo germination. II. Proteins related to nuclear proto-oncogene – and tumor supresor gene- products. *Planta.* 192: 125-129.
- Gómez-Roig, E. y Vázquez-Ramos, J. M. 2003. Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/CDK kinase effect of benziladenine. *J. Plant Physiol.* 160: 983-990.

- González-Zertuche, L., Vázquez-Yanes, C., Gamboa, A., Sánchez-Coronado, M. E., Aguilera, P. y Orozco-Segovia, A. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci. Res.* 11: 27-34.
- Gutiérrez-Aguilar, R. 2004. Caracterización molecular y bioquímica de la ciclina D de maíz. Tesis de Maestría. UNAM.
- Hardegree, S. P. y Emerich, W. E. 1992. Effect of matric-priming duration and priming water potential on germination of four grasses. *J. Exp. Bot.* 43: 233-238.
- Hardegree, S. P., Jones, T. A. y Van Vactor, S. 2002. Variability in thermal response of primed and non-primed seeds of squirreltail [*Elymus elymoides* (Raf.) Swezey and *Elymus multisetus* (J. G. Smith) M. E. Jones]. *Ann. Bot.* 89: 311-319.
- Healy, S. J. M., Menges, M., Doonan, J. H., y Murray, J. A. H. 2001. The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase cdc2A but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* 276:7041-7047.
- Herrera, I., Sánchez, M. de la P., Molina J., Plasencia, J. y 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 protein. *Physiol. Plant.* 110: 127-134.
- Ishimi, Y. 1997. A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6 and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.* 272: 24508-24513
- Ito, M. 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* 43: 677-690.

- Job, C., Kersulec, A., Ravasio, L., Chareyre, S., Papin, R. y Job, D. 1997. The solubilization of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming and early germination. *Seed Sci. Res.* 7: 225-243.
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, function and interactions. *Oncogene.* 14: 629-640.
- Kimura, S., Ishibashi, T., Hatanaka, M., Sakakibara, Y., Hashimoto, J. y Sakaguchi, K. 2000. Molecular cloning and characterization of a plant homologue of the origin recognition complex 1 (ORC1). *Plant Sci.* 158: 33-39.
- Kosugi, S. y Ohashi, Y. 2002. E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J.* 29: 45-59.
- Lanteri, S., Kraak, H. L., De Vos, R. y Bion, R. J. 1993. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annum*). *Physiol. Plant.* 89. 433-440.
- Liang, C. y Stillman, B. 1997. Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev.* 11: 3377-3386.
- Liu, Y., van der Burg, W.J., Aartse, J. W., van Zwol, R. A., Jalink, H. y Bino R. J. 1993. X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and imbibition of tomato seeds. *Seed Sci. Res.* 3: 171-178.
- Liu, Y., Bino, R. J., van der Burg, W. J., Groot, S. P. C. y Hilhorst, H. W. M. 1996. Effects of osmotic priming on dormancy and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Seed Sci. Res.* 6: 49-55.

- Luque, A. E., Touille, J. P. y Castroviejo, M. 2000. Subunit composition of DNA polymerases A and B from wheat cell. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 551-558.
- Martín-Castellanos y C., Moreno, S. 1997. Recent advances on cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* 7: 95-98.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. y Inzé D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants –the nexus. *Plant Cell.* 11: 509-521.
- Nascimento, W. M., Cantliffe, D. J. y Huber D. J. 2001. Endo- $\beta$ -mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming. *Seed Sci. Res.* 11: 255-264.
- Özbingöl, N., Corbineau, F. y Côme, D. 1998. Responses of tomato seeds to osmoconditioning as related to temperature and oxygen. *Seed Sci. Res.* 8: 377-384.
- Pollock, B. M. y Roos, E. E. 1972. Seed and seedling vigor in seed biology. p. p. 314-388. en Koslowsky, T. T.(Eds). *Seed storage and longevity in seed biology* Vol. I. New York. Academic Press.
- Reyes, J., Jiménez-García, L. F., González, M. A. y Vázquez-Ramos, J. M. 1991. Benziladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.* 1: 113-117.
- Richard, C., Léscot, M., Inzé, D. y 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. Cult.* 69: 167-176.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. y 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

- Rossi, V., Locatelli, S., Lanzanova, C., Boniotti, B., Varotto, S., Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Gatz, C., Gutierrez, C. y Moto, M. 2003. A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant. Mol. Biol.* 51: 401-413
- Sánchez-Jiménez, M. de la P., Cruz García, F., Covarrubias Robles, A. y Vázquez Ramos, J. 1997. Osmocondicionamiento de semillas de frijol: Establecimiento y caracterización. *Agrociencia.* 31: 305-311.
- Sánchez, M. de la P., Torres, A., Boniotti, M. B., Gutiérrez, C. y Vázquez-Ramos, J. M. 2002. PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
- Saracco, F., Bino, R. J., Bergervoet, J. H. W. y Lanteri, S. 1995. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. *Seed Sci. Res.* 5: 25-29.
- Sen, S. y Osborne, D. J. 1974. Germination of rye embryos following hydration-dehydration treatments. Enhancement of protein and RNA synthesis and earlier induction of DNA replication. *J. Exp. Bot.* 25: 1010-1019.
- Shatters, R. G., Abdelghany, A., Elbagoury, O. y West, S. H. 1994. Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Sci. Res.* 4: 33-41.
- Sherr, C. J. y Roberts, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. 1999. *Genes Dev.* 13: 1501-1512.
- Segers, G., Gadisseur, I., Bergonioux, C., de Almeida, E. J. y Jaqmar, A. J. 1996. The Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene *dc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J.* 10: 601-612.

- Tarquis, A. M. y Bradford, K. J. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. *J. Exp. Bot.* 43: 307-317.
- Taylor, A. G., Allen, P. S., Bennett, M., A., Bradford, K. J., Burris, J. S. y Misra, M. K. 1998. Seed enhancements. *Seed Sci. Res.* 8: 245-256.
- Trimarchi, J. M. y Lees, J. A. 2001. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 11-20.
- Tsurimoto, T. 1998. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 1443:23-39.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whithwill, S. y Fowke, L. C. 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* 24: 613-623.

## XI. ANEXO DE SOLUCIONES

Reactivos empleados para el OSMA:

CAPTAN 0.05%

Se pesaron 0.5g del fungicida y se aforo a 1 lt. Se almaceno a temperatura ambiente.

PEG 8000 38%

Se pesaron 380g de PEG 8000 y se aforo a 1l. Se esterilizo a 121 lb de presión durante 15 minutos y se almaceno a temperatura ambiente.

Reactivos empleados para la obtención del extracto crudo:

Buffer de homogeneización

Tris HCl pH 7.4	70 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	25 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	0.1%
β-mercaptoetanol	15 mM
Sacarosa	0.25 mM

La solución fue esterilizada por filtración y se almaceno a 4°C. Solo hasta el momento de usarla se agrego el inhibidor de proteasas.

Coctel de inhibidores de proteasas –Complete®- (Stock)

Se disolvió una tableta en 1 ml de agua destilada. De este stock se tomaron 20 µl por cada ml de buffer de homogeneización. Se almaceno a –70°C.

Reactivos empleados para la determinación de la concentración de proteína en extractos crudos:

Solución stock de albúmina de suero bovino (BSA)

Se pesó 1mg de BSA y se disolvió para un volumen final de 1ml. Se almacena a -70°C.

Reactivo de Bradford

Azul de Coomassie

Acido tricloroacético 24.9 ml

Se aforo a 1 lt

La solución se filtró y se almacena a temperatura ambiente en una botella ámbar.

Reactivos empleados para la preparación de geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Acrilamida 30%

Acrilamida

Metilen-bis-acrilamida

Buffer gel separador (2x)

Tris HCl pH 8.8

SDS

Buffer gel apilador (2x)

Tris HCl pH 6.8

SDS

Persulfato de amonio (15%)

Se tomaron 1.5g y se disolvieron en un volumen final de 10 ml.

TEMED

Todos los reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida se almacenaron a 4°C.

Reactivos empleados para la electroforesis:

Buffer de carga (4x)

Tris HCl pH 6.8	100 mM
SDS	4%
Glicerol	20%
β-mercaptoetanol	200 mM
Azul de bromofenol	0.2%

Se almaceno a temperatura ambiente

Buffer de electrodos (10x)

Tris HCl pH 8.3	250 mM
Glicina	1.9 M
SDS	1%

Se almaceno a temperatura ambiente.

Reactivos empleados para la transferencia de proteínas a la membrana de Immobilon:

Buffer de transferencia

Tris HCl pH 8.3	95 mM
Metanol	20%
Glicina	192 mM

Se almaceno a 4°C.

Reactivos empleados en los experimentos Western blot

Buffer de fosfatos (PBS) 10x

NaCl	1.37 M
KCl	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 Mm
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM

Se esterilizó a 121 lb y se almaceno a temperatura ambiente.

NaCl 5M

Se pesaron

Se esterilizó a 121 lb y se almaceno a temperatura ambiente.

Solución de bloqueo

Leche semidescremada

Tween

PBS

Soluciones empleadas en la purificación parcial de las actividades específicas de las DNA polimerasas tipo  $\alpha$  y  $\delta$ :

Buffer para la activación de DNA de alto peso molecular

Tris HCl pH 7.4	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
BSA	0.5 mg/ml

Activación de DNA de alto peso molecular

Al buffer de activación se agregó DNA de timo de ternera a una concentración de 0.5 mg/ml y 0.01 mg de DNasa I. Transcurrido este tiempo se desnaturalizó la DNasa incubando 5 minutos a 77°C y posteriormente se enfrió rápidamente.

Mezcla de reacción

Tris HCl pH 7.4	50 mM
KCl	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 mM
dATP	0.1 mM
dGTP	0.1 mM
dCTP	0.1 Mm
Glicerol	5%
β-mercaptoetanol	0.4 mM
ATP	1 Mm
DNA activado	100 µg/ml
Metil [ <sup>3</sup> H]-Timidina-5-trifosfato	5µCi/ml

Liquido de centelleo

2,2-p-fenil-bis-5-feniloxazol (POPOP)	0.1g
2,5-difenil-oxazol (PPO)	5g
Tolueno	1l