

# ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ADN Y DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR POR AUXINAS DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

## AUXIN-STIMULATION OF DNA SYNTHESIS AND CELL CYCLE PROTEINS DURING MAIZE GERMINATION

Yazmín Arellano, Elpidio García y Jorge M. Vázquez-Ramos<sup>1\*</sup>

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad y Copilco, México D.F. 04510, México. (jorman@servidor.unam.mx)

### RESUMEN

El establecimiento y progreso del ciclo celular son eventos importantes para la germinación de las semillas. En maíz las auxinas y las citocininas añadidas exógenamente estimulan la síntesis de ADN durante las horas tempranas de la germinación y este efecto depende, en mayor o menor grado, de la presencia de sacarosa en el medio de imbibición. No obstante, en ausencia de hormonas añadidas exógenamente, la presencia o ausencia de sacarosa no afecta la síntesis de ADN a tiempos tempranos o tardíos de la germinación. Por tanto, el efecto de los fitorreguladores se relacionaría más con la estimulación de una acción mitogénica, que con el proceso germinativo *per se*. Al medir la presencia de proteínas específicas de las fases G1 y S del ciclo celular, en presencia de auxinas, fue evidente que marcadores de G1 como las ciclinas D2;1 y D4;1, o bien marcadores de la fase S como ciclina A1 o PCNA, no cambiaron sus niveles durante la germinación. Además, los niveles de un marcador de G1, la ciclina D5;2 y un marcador de la fase S, la ADN polimerasa  $\alpha$ , aumentaron visiblemente en respuesta a la adición de auxinas. Esta respuesta y en particular la de la ADN polimerasa  $\alpha$ , podría explicar el aumento en la síntesis de ADN causada por la adición de auxinas en ejes embrionarios durante la germinación.

**Palabras clave:** *Zea mays*, auxinas, ciclo celular, germinación.

### INTRODUCCIÓN

La germinación de las semillas es importante en el ciclo de vida de una planta y para perpetuar la especie. Este proceso empieza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente con la emergencia de la radícula. El proceso incluye: hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares (reparación de membranas, de ADN), respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Bewley y Black, 1994). El resultado combinado

### ABSTRACT

The establishment and progress of the cell cycle are important events for the germination of seeds. In maize the auxins and the exogenously added cytokinins stimulate the synthesis of DNA during the early hours of germination, and this effect depends, to a greater or lesser extent, on the presence of sucrose in the imbibition buffer. However, in the absence of exogenously added hormones, the presence or absence of sucrose does not affect the synthesis of DNA at early or late times of germination. Therefore, the effect of the phyto regulators would be more related to the stimulation of a mitogenic action, than to the germinative process *per se*. When measuring the presence of specific proteins of the phases G1 and S of the cell cycle, in the presence of auxins, it was evident that markers of G1 such as the cyclins D2;1 and D4;1, or markers of the S phase such as cyclin A1 or PCNA, did not change their levels during germination. Besides, the levels of a marker of G1, the cyclin D5;2 and a marker of the S phase, the DNA polymerase  $\alpha$ , increased visibly in response to the addition of auxins. This response and in particular that of DNA polymerase  $\alpha$ , could explain the increase in the synthesis of DNA caused by the addition of auxins in embryonic axes during germination.

**Key words:** *Zea mays*, auxins, cell cycle, germination.

### INTRODUCTION

The germination of seeds is important in the life cycle of a plant and to perpetuate the species. This process begins with the entrance of water to the seed (imbibition) and ends with the elongation of the embryonic axis, generally with the emergence of the radicle. The process includes: hydration of proteins, sub-cellular structural changes (membrane repair, DNA repair), respiration, synthesis of macromolecules and cellular elongation (Bewley and Black, 1994). The combined result is the conversion of a dehydrated embryo, with an almost null metabolism, into an embryo with an active and vigorous metabolism. Biochemically, germination involves the successful consecution of a series of molecular processes

\* Autor responsable.

Recibido: Enero, 2008. Aprobado: Julio, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 637-644, 2008.

es la conversión de un embrión deshidratado, con un metabolismo casi nulo, en un embrión con un metabolismo activo y vigoroso. Bioquímicamente la germinación involucra la consecución exitosa de la serie de procesos moleculares que anteceden a la primera ronda de división celular, que es esencial para la proliferación requerida para el establecimiento de la plántula (Vázquez y Sánchez, 2003).

La división de una célula en dos idénticas resulta de la acción de múltiples proteínas durante un proceso molecular denominado ciclo celular. Las células pasan de un estado G1, o de reconocimiento del ambiente y de acumulación de materiales celulares y de energía, altamente regulado, a una fase S donde se duplica el ADN. Luego, la fase G2 funciona como una etapa de revisión de integridad genética y celular, la fase M o de mitosis, donde el material genético previamente duplicado, es segregado en paquetes cromosómicos idénticos a las células hijas. La regulación de la transición entre las diferentes fases del ciclo celular está dada, en parte, por motores moleculares que causan grandes cambios metabólicos a partir de la fosforilación de proteínas blanco, formados por proteínas ciclinas y por cinasas que dependen de las primeras. Hay ciclinas de cada fase del ciclo celular y generalmente son destruidas al terminar cada etapa. La cinasa, o enzima que fosforila proteínas, requiere de la ciclina para activarse, por lo que se denomina cinasa dependiente de ciclina o CDK; así, la desaparición de la ciclina en cada fase causa la caída en la actividad de la cinasa asociada (Pines, 1993). En células de eucariotes superiores, como las de plantas, las ciclinas de G1 se denominan ciclinas D y hay varios tipos (Quelle *et al.*, 1993, Renaudin *et al.*, 1996). Otras como las ciclinas A y B, funcionan en S/G2 y G2/M, siempre asociadas a CDKs (Renaudin *et al.*, 1996).

La investigación se ha centrado en el estudio de la fase G1 y de la transición hacia la fase S durante la germinación de semillas de maíz, fases muy importantes para una germinación exitosa de las semillas (Elder *et al.*, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1993; Vázquez y Sánchez, 2003). Se han clonado varias ciclinas D (Quiroz y Vázquez, 2006) y se ha demostrado que este tipo de proteínas se asocian a CDKs y a otras proteínas (Lara *et al.*, 2008); entre ellas destaca el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), un factor esencial que permite a las ADN polimerasas duplicar eficientemente el ADN (Prelich *et al.*, 1987). Además PCNA se asocia a complejos ciclinas-cinasas, pero su función y propósito son materia de especulación (Sánchez *et al.*, 2002).

Los fitoreguladores controlan procesos múltiples en la vida de los vegetales, entre los que destaca la germinación. Hormonas como el ácido abscísico inhiben la germinación, mientras que otras como las giberelinas,

that antecede the first part of cell division, which is essential for the proliferation required for the establishment of the seedling (Vázquez and Sánchez, 2003).

The division of a cell into two identical cells results from the action of multiple proteins during a molecular process called cell cycle. The cells pass from a G1 state, or of recognition of the environment and the accumulation of cell materials and of energy, highly regulated, to an S phase where the DNA is duplicated. Later, the G2 phase functions as a stage of revision of genetic and cellular integrity, the M phase or mitosis, where the previously duplicated genetic material is segregated as identical chromosome sets to the daughter cells. The regulation of the transition between the different phases of the cell cycle is due, in part, to molecular motors that cause great metabolic changes through the phosphorylation of target proteins, formed by cyclin proteins and by kinases which depend on the first. There are cyclins of each phase of the cell cycle and they are generally destroyed at the end of each stage. The kinase, or enzyme that phosphorylates proteins, requires the cyclin to become activated, hence it is called cyclin dependent kinase or CDK; thus, the disappearance of the cyclin in each phase causes the drop in the activity of the associated kinase (Pines, 1993). In cells of higher eucaryotes, such as those of plants, the G1 cyclins are called D cyclins, of which there are various types (Quelle *et al.*, 1993; Renaudin *et al.*, 1996). Others such as A and B cyclins, function in S/G2 and G2/M, always associated with CDKs (Renaudin *et al.*, 1996).

The investigation has been focused on the study of the G1 phase and on the transition to the S phase during the germination of maize seeds, phases which are very important for a successful germination (Elder *et al.*, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1993; Vázquez and Sánchez, 2003). Various D cyclins have been cloned (Quiroz and Vázquez, 2006), and it has been demonstrated that this type of proteins are associated to CDKs as well as to other proteins (Lara *et al.*, 2008), among which the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an essential factor that allows the DNA polymerase to efficiently duplicate the DNA, can be found (Prelich *et al.*, 1987). Furthermore, PCNA is associated with cyclin-kinase complexes, but its function and purpose are a matter of speculation (Sánchez *et al.*, 2002).

The phyto regulators control multiple processes in the life of plants, among which germination is outstanding. Hormones such as abscisic acid inhibit germination, whereas others such as the gibberelins, auxins or cytokinins stimulate it in a species-dependent form. Cytokinins such as benzyladenine stimulate the cell cycle during the germination of maize, apparently

auxinas o citocininas la estimulan de manera especie-dependiente. Citocininas como la benciladenina estimulan el ciclo celular durante la germinación de maíz, aparentemente acelerando la fase G1 (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005), mientras que el ácido abscísico la inhibe (Sánchez *et al.*, 2005). El mecanismo de estos procesos es aún materia de especulación.

Las auxinas estimulan notablemente, a nivel transcripcional, la expresión de cuatro ciclinas tipo D durante la germinación de maíz, proteínas que participarían activamente en la activación de la fase G1 (Quiroz y Vázquez, 2006), particularmente considerando que la mayoría de las células en los ejes embrionarios de semillas secas de maíz se encuentran en esta fase. Por tanto, es importante estudiar el efecto de este fitorregulador a nivel de acumulación de proteínas, sobre diferentes marcadores de las fases G1 y S, para tratar de explicar como las auxinas estimulan la germinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Las semillas de maíz criollo variedad Chalqueño usadas en este trabajo fueron obtenidas de un agricultor del Valle de Chalco, Estado de México, y presentaron una viabilidad mayor a 95%.

### Imbibición de ejes embrionarios de semillas de maíz

Los ejes embrionarios se disectaron de semillas de maíz y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Para su imbibición, los ejes embrionarios se trataron por el método tradicional (Herrera *et al.*, 2000). El ácido indol-3 acético (AIA) se adicionó al amortiguador a concentraciones de  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  ó  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> y la concentración de benciladenina (BA) fue  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

### Síntesis de ADN durante la germinación de ejes embrionarios de maíz

La síntesis de ADN se cuantificó según el método de Reyes *et al.* (1991), usando [metil<sup>-3</sup>H] timidina (solución acuosa 5 mCi/5.0 mL, Amersham Biosciences) como el sustrato radiactivo incorporado al ADN. Se añadieron benciladenina (BA) o ácido indol 3-acético (AIA) a ejes embrionarios, se germinaron por 15 h y al final se midió la incorporación de timidina tritiada al ADN.

### Preparación de extractos crudos de proteínas de ejes embrionarios de maíz

Se colocaron 10 ejes embrionarios de maíz en amortiguador de imbibición en un mortero a 4 °C. Se homogeneizaron agregando 1 mL de solución de extracción de proteínas (25 mmol mL<sup>-1</sup> Tris-HCl

accelerating the G1 phase (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005), while abscisic acid inhibits it (Sánchez *et al.*, 2005). The mechanism of these processes is still a matter of speculation.

The auxins notably stimulate, at the transcriptional level, the expression of four D-type cyclins during the germination of maize, proteins that actively participate in the activation of the G1 phase (Quiroz and Vázquez, 2006), particularly considering that the majority of the cells in the embryonic axes of dry maize seeds are found in this phase. Therefore, it is important to study the effect of this phytohormone, at the level of protein accumulation, on different markers of the G1 and S phases, to try and explain how the auxins stimulate germination.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The seeds of creole maize variety Chalqueño used in the present study were obtained from a farmer in the Valley of Chalco, State of México, and presented a viability of over 95%.

### Imbibition of maize embryonic axes

The embryonic axes of maize seeds were dissected and stored at 4 °C until they were used. For their imbibition, the embryonic axes were treated according to the traditional method (Herrera *et al.*, 2000). The indol 3-acetic acid (IAA) was added to the buffer at concentrations of  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  or  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> and the concentration of benzyladenine (BA) was  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

### Synthesis of DNA during the germination of maize embryonic axes

DNA synthesis was quantified according to the method of Reyes *et al.* (1991), using [methyl<sup>-3</sup>H] thymidine (aqueous solution 5 mCi/5.0 mL, Amersham Biosciences) as the radioactive substrate incorporated to the DNA. Benzyladenine (BA) or indol 3-acetic acid was added to embryonic axes, which were germinated for 15 h and at the end the incorporation of tritiated thymidine to the DNA was measured.

### Preparation of crude protein extracts from embryonic axes of maize

Ten embryonic axes of maize were placed in imbibition buffer in a mortar at 4 °C. They were homogenized adding 1 mL of extraction solution of proteins (25 mmol mL<sup>-1</sup> Tris.HCl pH 7.5, 25 mmol mL<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 75 mmol mL<sup>-1</sup> NaCl, 5 mmol mL<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8, 1 mmol mL<sup>-1</sup> DTT, 0.2% Triton X-100, 250 mmol mL<sup>-1</sup> sucrose, 60 mmol mL<sup>-1</sup> glycerol, 50 mmol mL<sup>-1</sup> NaF, 200 μmol μ L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol mL<sup>-1</sup> EGTA) and a tablet of

pH 7.5, 25 mmol mL<sup>-1</sup> KCl, 15 mmol mL<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 75 mmol mL<sup>-1</sup> NaCl, 5 mmol mL<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8, 1 mmol mL<sup>-1</sup> DTT, 0.2% Tritón X-100, 250 mmol mL<sup>-1</sup> sacarosa, 60 mmol mL<sup>-1</sup> glicerol, 50 mmol mL<sup>-1</sup> NaF, 200 μmol μL<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol mL<sup>-1</sup> EGTA y una tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete de Böhinger-Mannheim) por cada 50 mL de amortiguador. Finalmente se centrifugaron a 30 000 rpm/4 °C en una centrífuga Sorvall TL100 (Dupont) y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf almacenándolo a -70 °C.

#### Cuantificación de proteína

Las proteínas en los extractos de ejes embrionarios germinados por diferentes tiempos se cuantificaron por el método de Bradford (1976).

#### Electroforesis

Las muestras (30 μg proteína) se prepararon y cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante a 12%. Las electroforesis se efectuaron por 4 h/80 V, en una cámara Mini-Protean II de Bio-Rad.

#### Transferencia

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana Immobilon-P (Millipore) por 1h/75 mA, en un Trans-blot SD Semi dry transfer cell de Bio-Rad. Las membranas de Immobilon-P se solvataron en metanol absoluto por 30 s y se depositaron en amortiguador de transferencia (14.4 g glicina, 25 mL Tris-HCl pH 8.3, 200 mL metanol, aforando a 1000 mL de agua) por 5 min. Los geles también fueron incubados en solución de transferencia por el mismo tiempo. Se colocó el electrodo que corresponde al ánodo, seis papeles Whatman 3MM sobre el electrodo, la membrana de Immobilon-P, el gel sobre la membrana y tres papeles Whatman 3MM sobre el gel. Se colocó el electrodo que corresponde al cátodo y se transfirió el gel a 75 mA/1 h.

#### Inmunodetección (Western blot)

Al terminar la transferencia la membrana fue bloqueada con una solución que contenía PBS 1X (4 g NaCl, 0,1 g KCl, 1.36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.14 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) y se completó a un volumen final de 50 mL con agua), más leche semidescremada al 5% y Tween 20 a 0.9% por 1 h. Se incubó con el anticuerpo respectivo (primer anticuerpo) por 12 h en esta solución a 4 °C con agitación constante. Terminada la incubación, se realizaron lavados con 10 mL PBS 1X/15 min, con 10 mL PBS 1X + NaCl 0.5 mol L<sup>-1</sup>/15 min, y con 10 mL PBS 1X/15 min y se colocó el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa 1:10 000 (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h. Se realizaron los mismos lavados efectuados para el primer anticuerpo. En un cuarto oscuro se adicionó una solución quimioluminiscente (ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents de Amersham Biosciences) y se revelaron las membranas sobre películas para autoradiografía (Hyperfilm<sup>TM</sup> de Amersham Biosciences).

a mixture of proteases inhibitors (Complete of Böhinger-Mannheim) for each 50 mL of buffer. Finally, they were centrifuged at 30 000 rpm/4 °C in a Sorvall TL100 centrifuge (Dupont) and the supernatant was transferred to an Eppendorf tube and stored at -70 °C.

#### Quantification of protein

The proteins in extracts of embryonic axes germinated for different times were quantified by the Bradford method (1976).

#### Electrophoresis

Proteins (30 μg) were prepared and separated in a SDS-polyacrylamide denaturing gel at 12%. The electrophoreses were carried out for 4 h/80 V, in a Mini-Protean II chamber of Bio-Rad.

#### Transfer

The separated proteins were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore) for 1 h/75 mA, in a Trans-blot SD Semi dry transfer cell of Bio-Rad. The membranes of Immobilon-P were solvated in absolute methanol for 30 s and were deposited in transfer buffer (14.4 g glycine, 25 mL Tris-HCl pH 8.3, 200 mL methanol, completing to a final volume of 1000 mL with water) for 5 min. The gels were also incubated in transfer solution for the same amount of time. The electrode corresponding to the anode was set in place, six Whatman 3MM papers were placed over the electrode, the membrane of Immobilon-P, the gel over the membrane and three Whatman 3MM papers over the gel. The electrode corresponding to the cathode was placed and the gel was transferred at 75 mA/1 h.

#### Immunodetection (Western blot)

When the transfer was finished the membrane was blocked with a solution containing PBS 1X (4g NaCl, 0,1 g KCl, 1.36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.14 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) and was completed to a final volume of 50 mL with water), plus semi-skimmed milk at 5% and Tween 20 at 0.9% for 1 h. It was incubated with the respective antibody (first antibody) for 12 h in this solution at 4 °C with constant agitation. When the incubation was concluded, washings were carried out with 10 mL PBS 1X/15 min, with 10 mL PBS 1X + NaCl 0.5 mol L<sup>-1</sup>/15 min, and with 10 mL PBS 1X/15 min, and the second antibody was placed, rabbit anti-IgG coupled to peroxidase 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h. The same washings were made that had been done for the first antibody. In a darkroom, a chemiluminescent solution (ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents of Amersham Biosciences) was added, and the membranes were developed on films for autoradiography (Hyperfilm<sup>TM</sup> of Amersham Biosciences).

## RESULTS AND DISCUSSION

Given that the auxins participate in processes of elongation, proliferation and cell growth, a study was

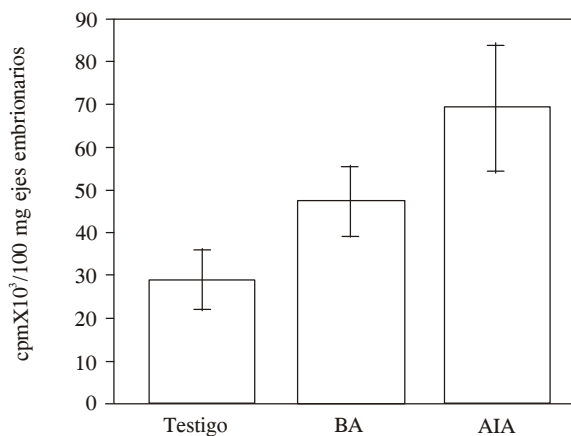
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que las auxinas participan en procesos de elongación, proliferación y crecimiento celulares, se estudió el efecto que causa el ácido indol-3 acético (AIA) sobre la síntesis de ADN en las horas iniciales de la germinación en ejes embrionarios de semillas de maíz. Como testigo se incubaron ejes con benciladenina (BA,  $10^{-6}$  M) que recorta el tiempo de entrada a la fase S y estimula la síntesis de ADN durante la germinación de maíz; BA estimuló la síntesis de ADN en 50% en ejes embrionarios incubados 15 h, tiempo al cual la fase S ya ha comenzado (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005; Figura 1). La adición de AIA ( $10^{-5}$  M a  $10^{-7}$  M) a los ejes embrionarios aumentó la síntesis de ADN a niveles semejantes o mayores a aquellos en respuesta a BA en el mismo tiempo, sugiriendo que las auxinas también estimulan el ciclo celular durante la germinación de maíz.

La estimulación del ciclo celular en plantas por citocininas requiere la presencia de sacarosa (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). En maíz, la presencia de sacarosa es importante para la estimulación de genes del ciclo celular por BA durante la germinación (Gutiérrez *et al.*, 2005). Dada la presencia de sacarosa en el amortiguador de imbibición, se probó el efecto que su ausencia provocaría en la estimulación de la síntesis de ADN por BA y AIA. En su ausencia se eliminó el efecto estimulador por BA (Figura 2A), mientras que AIA estimuló la síntesis de ADN, aunque sólo un 25%, sugiriendo que la estimulación de la síntesis de ADN por AIA también requiere la presencia de sacarosa (Figura 2A). En presencia de sacarosa, ambas hormonas estimularon de forma importante la síntesis de ADN (Figura 2B). Las variaciones entre experimentos en cuanto al grado de estimulación suceden con frecuencia y quizás se deban a la heterogeneidad de los lotes de semillas, dado que el Chalqueño es un maíz criollo.

Es importante señalar que la síntesis de ADN en experimentos testigo (sin añadir fitoreguladores) no se modifica en ausencia de sacarosa, ni aún después de 30 h de imbibición (datos no mostrados). Esto sugiere que los ejes embrionarios de maíz tienen la suficiente fuente de carbono para el proceso germinativo y que el efecto que produce la sacarosa (o sus metabolitos) al adicionar de los fitoreguladores se relacionaría más con una estimulación de una acción mitogénica, que con el proceso germinativo *per se*.

La estimulación de la síntesis de ADN por auxinas, en presencia de sacarosa, sugiere que el AIA impulsa el ciclo celular desde la fase G1. Se estudió entonces el comportamiento de proteínas del ciclo celular de la fase G1 como las ciclinas D5;2, D4;1 y D2;1, y de la

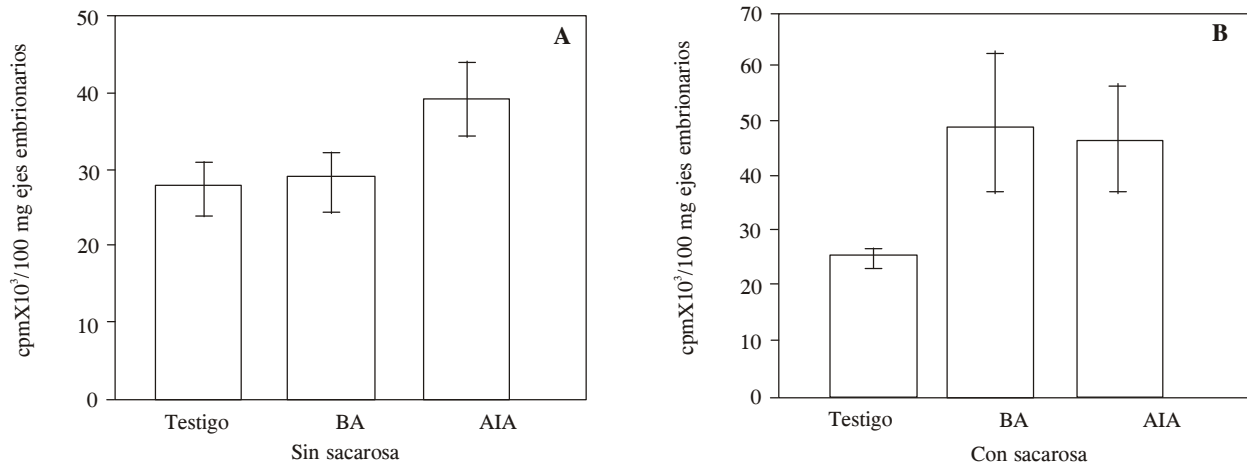


**Figura 1. Estimulación de la síntesis de ADN por fitoreguladores. Las barras significan desviación estándar (n=3).**

**Figure 1. Stimulation of the synthesis of DNA by phytohormones. The bars represent standard deviation (n=3).**

made of the effect that causes the indol-3 acetic acid (IAA) on the synthesis of DNA in the initial hours of germination in embryonic axes of maize seeds. As control, axes were incubated with benzyladenine (BA,  $10^{-6}$  M) which shortens the entrance time to the S phase and stimulates the synthesis of DNA during the germination of maize; BA stimulated the synthesis of DNA by 50% in embryonic axes incubated 15 h, time in which the S phase has already begun (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005; Figure 1). The addition of IAA ( $10^{-5}$  M to  $10^{-7}$  M) to the embryonic axes increased DNA synthesis at levels similar or greater than those in response to BA in the same time, suggesting that the auxins also stimulate the cell cycle during the germination of maize.

The stimulation of the cell cycle in plants by cytokinins requires the presence of sucrose (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). In maize, the presence of sucrose is important for the stimulation of cell cycle genes by BA during germination (Gutiérrez *et al.*, 2005). Given the presence of sucrose in the imbibition buffer, the effect that its absence would provoke on the stimulation of DNA synthesis by BA and IAA was proven. In its absence, the stimulatory effect of BA was eliminated (Figure 2A), whereas IAA stimulated DNA synthesis, although only by 25%, suggesting that the stimulation of the synthesis of DNA by IAA also requires the presence of sucrose (Figure 2A). In the presence of sucrose, both hormones stimulated in an important way the synthesis of DNA (Figure 2B). The variations among experiments with respect to the degree of stimulation occur frequently and perhaps are due to the heterogeneity of the seed lots, given that Chalqueño is a native seed.



**Figura 2.** Efecto de la sacarosa en la estimulación de la síntesis de ADN por fitorreguladores. Ejes embrionarios incubados sin (A) y con (B) sacarosa. Las barras significan desviación estándar (n=3).

**Figure 2.** Effect of sucrose on the stimulation of the synthesis of DNA by phytohormones. Embryonic axes incubated without (A) and with (B) sucrose. The bars represent standard deviation (n=3).

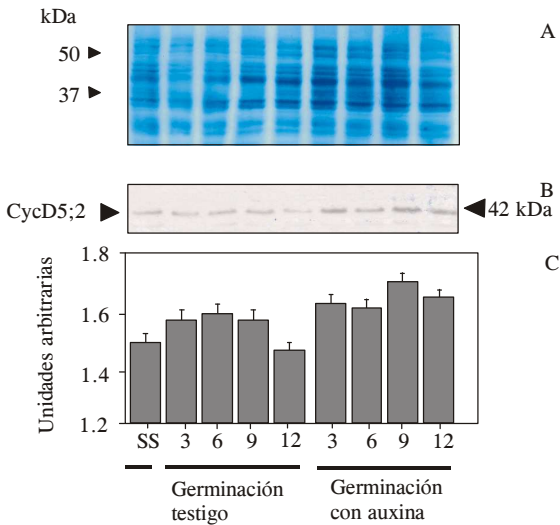
fase S, la ciclina A1, PCNA y la ADN polimerasa  $\alpha$ , a tiempos tempranos de la germinación usando anticuerpos específicos. Las ciclinas A1, D2;1 y D4;1 y PCNA no dieron respuesta alguna a la adición de AIA, comparadas con el testigo sin hormona añadida (datos no mostrados). El caso de PCNA es sorprendente, dado que es un marcador usado frecuentemente en estudios de proliferación celular y se ha demostrado que BA estimula notablemente su acumulación durante la germinación (Herrera *et al.*, 2000).

Los otros dos marcadores, la ciclina D5;2 (G1) y la ADN polimerasa  $\alpha$  (S), sí respondieron a la adición de AIA. La ciclina D5;2 presenta un aumento más rápido en las primeras 9 h de germinación, comparado con el testigo (Figura 3). La cantidad de ADN polimerasa  $\alpha$  en ejes embrionarios testigo no varió significativamente, mientras que en ejes tratados con auxinas hubo una ligera disminución inicial hacia las 3 h, que se revierte gradualmente y, hacia las 12 h la cantidad de enzima es mayor a la observada a las 3 h en embriones tratados y ligeramente mayor a la presente en ejes no imbibidos (Figura 4). Durante la germinación testigo la cantidad de la ADN polimerasa  $\alpha$  no cambia durante las primeras 12 h de germinación (Coello y Vázquez, 1995). Es posible que las auxinas provoquen su recambio en las primeras horas de la germinación para después promover su recuperación mediante un proceso de síntesis *de novo* y quizás también de su activación. De ser el caso, quizás esta nueva enzima responda a la estimulación hormonal y, por tanto, es la responsable del aumento en la síntesis de ADN reportada aquí. Complejos ciclina-Cdk de maíz fosforilaban y activaban a la ADN polimerasa  $\alpha$  en tiempos donde la fase S progresa (entre las 12 y 20 h de germinación), y la

It is important to point out that the synthesis of DNA in control experiments (without the addition of phytohormones) is not modified in the absence of sucrose, even after 30 h of imbibition (data not shown). This suggests that the embryonic axes of maize have a sufficient carbon source for the germinative process and that the effect produced by the sucrose (or its metabolites) when added together with the phytohormones would be more related to a stimulation of a mitogenic action, than with the germinative process *per se*.

The stimulation of DNA synthesis by auxins, in the presence of sucrose, suggests that the IAA impulses the cell cycle from the G1 phase. Thus, a study was made on the behavior of G1 cell cycle proteins such as the cyclins D5;2, D4;1 and D2;1, and of the S phase, the cyclin A1, PCNA and the DNA polymerase  $\alpha$ , at early times of germination using specific antibodies. The cyclins A1, D2;1 and D4;1 and PCNA gave no response to the addition of IAA, compared with the control with no added hormone (data not shown). The case of PCNA is surprising, given that it is a frequently used marker in studies of cell proliferation and it has been demonstrated that BA notably stimulates its accumulation during germination (Herrera *et al.*, 2000).

The other two markers, the cyclin D5;2 (G1) and the DNA polymerase  $\alpha$  (S), did respond to the addition of IAA. The cyclin D5;2 presents a more rapid increase in the first 9 h of germination, compared with the control (Figure 3). The amount of DNA polymerase  $\alpha$  in control embryonic axes did not vary significantly, while in axes treated with auxins there was a slight initial decrease by around 3 h, which gradually was



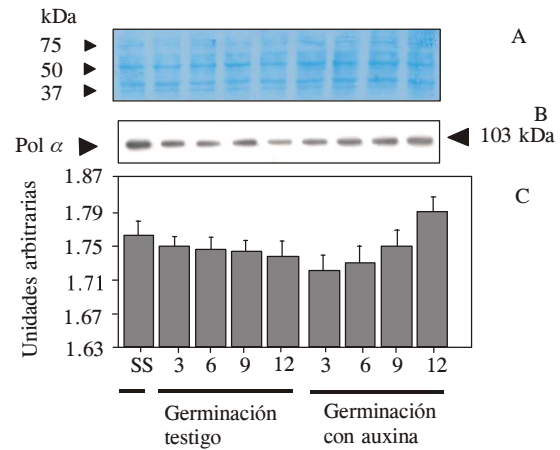
**Figura 3. Efecto de auxinas en la acumulación de ciclina D5;2.** A) separación de proteínas por gel de acrilamida; B) inmunodetección; C) análisis densitométrico de los niveles de ciclina D5;2, usando los niveles de proteína cargada por carril en A) como referencia. Las barras significan desviación estándar  $n=5$ . SS=semilla seca.

**Figure 3. Effect of auxins on the accumulation of cyclin D5;2.** A) separation of proteins by acrylamide gels; B) immunodetection; C) densitometric analysis of the levels of cyclin D5;2, using the levels of separated proteins per lane in A) as reference. The bars represent standard deviation ( $n=5$ ). SS=dry seed.

activación era mayor en presencia de BA (Gómez y Vázquez-Ramos 2003), la que acelera el tiempo de entrada a la fase S (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, entonces no había las herramientas moleculares para determinar la ciclina presente. Aunque se muestra aquí que la cantidad de ciclina D5;2 aumenta por la adición de AIA, se desconoce si ésta es la ciclina que participa en la activación de la polimerasa, pero evidentemente es una línea de investigación muy interesante.

### CONCLUSIONES

La síntesis de ADN es estimulada de forma importante por auxinas y citocininas durante la germinación de maíz, implicando que estas sustancias modifican los tiempos del ciclo celular, lo que debería repercutir en el comportamiento de proteínas que participan en la entrada al ciclo. La respuesta no corresponde a una estimulación global de marcadores específicos de las fases G1 y S del ciclo, y sólo proteínas como la ciclina D5;2 y la ADN polimerasa  $\alpha$  responden al estímulo hormonal. Finalmente, la fuente carbonada en el amortiguador en que se embeben los ejes embrionarios durante la germinación no parece relevante



**Figura 4. Efecto de auxinas en la acumulación de ADN polimerasa  $\alpha$ .** A) Separación de proteínas por gel de acrilamida; B) inmunodetección; C) análisis densitométrico de los niveles de ADN polimerasa  $\alpha$ , usando los niveles de proteína cargada por carril en A) como referencia. Las barras significan desviación estándar ( $n=5$ ). SS=semilla seca.

**Figure 4. Effect of auxins on the accumulation of DNA polymerase  $\alpha$ .** A) Separation of proteins by acrylamide gels; B) immunodetection; C) densitometric analysis of the levels of DNA polymerase  $\alpha$ , using the levels of separated proteins per lane in A) as reference. The bars represent standard deviation ( $n=5$ ). SS=dry seed.

reverted, and at around 12 h the amount of enzyme was greater than that observed at 3 h in treated embryos and slightly higher than that present in unimbibed axes (Figure 4). During the control germination, the amount of DNA polymerase  $\alpha$  does not change during the first 12 h of germination (Coello and Vázquez, 1995). It is possible that the auxins provoke its turnover in the first hours of germination, to later promote its recovery by means of a process of de novo synthesis and perhaps also of its activation. If this is the case, perhaps this new enzyme responds to hormonal stimulation, and therefore, is responsible for the increase in the synthesis of DNA reported here. Cyclin-Cdk complexes of maize phosphorylated and activated the DNA polymerase  $\alpha$  at times in which the S phase progresses (between 12 and 20 h of germination), and the activation was higher in the presence of BA (Gómez and Vázquez-Ramos, 2003), which accelerates the time of entrance to the S phase (Reyes *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2005). However, at that time we did not have the molecular tools for determining this type of cyclin. Although it is shown here that the amount of cyclin D5;2 increases as a result of the addition of IAA, it is unknown if this is the cyclin that participates in the activation of the polymerase, but evidently it is a very interesting line of investigation.

para que ocurra la síntesis de ADN, pero sí lo es para la estimulación de la síntesis promovida por los fitorreguladores.

#### AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo de las becas DGAPA-PAPIIT, IN-200706 y CONACYT 42896-Z para realizar esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Bewley, J.D., and M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*, 2nd Ed, Plenum Press, New York, NY. pp: 160-191.
- Bradford, M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-252.
- Coello, P., and J.M. Vázquez R. 1995. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* 231: 99-103.
- Elder, R.H., A. Dell'Aquila, M. Mezzina, A. Sarasin, and D.J. Osborne. 1987. DNA ligase in repair and replication in the embryos of rye, *Secale cereale*. *Mutation Res.* 181: 61-71.
- Gómez, E., and J.M. Vázquez-Ramos. 2003. Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex: effect of benzyladenine. *J. Plant Physiol.* 160: 983-990.
- Gutiérrez, G., F. Cruz, J. Moreno, V. González H., and J.M. Vázquez R. 1993. Natural and artificial seed ageing in maize: Germination and DNA metabolism. *Seed Sci. Res.* 3: 279-285.
- Gutiérrez, R., F. Quiroz F., and J.M. Vázquez R. 2005. Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant and Cell Physiol.* 46: 166-173.
- Herrera, I., M.P. Sánchez, J. Molina, J. Plasencia, and J.M. Vázquez R. 2000. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination. Regulation by phytohormones and its association with cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* 110: 127-134.
- Lara N., A., N. de Jesús, and J.M. Vázquez R. 2008. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum* 132: 79-88.
- Pines, J. 1993. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partner. *Trends in Biochem. Sci.* 18: 195-197.
- Quelle, D.E., R.A. Ashmun, S.S. Shurtleff, J. Kato, D. Bar Sagi, M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 1993. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerate G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes and Develop.* 7: 1559-1571.
- Quiroz F., and J.M. Vázquez R. 2006. Maize D-Type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiologia Plantarum* 28: 556-568.

#### CONCLUSIONS

The synthesis of DNA is stimulated in an important way by auxins and cytokinins during the germination of maize, implying that these substances modify the times of the cell cycle, which must have repercussions on the behavior of proteins that participate in the entrance to the cycle. The response does not correspond to a global stimulation of specific markers of the phases G1 and S of the cycle, and only proteins such as the cyclin D5;2 and the DNA polymerase a respond to the hormonal stimulus. Finally, the carbon source in the buffer in which the embryonic axes are imbibed during germination does not appear to be relevant for the occurrence of the synthesis of DNA, but it is for the stimulation of the synthesis promoted by the phyto regulators.

—Fin de la versión en Español—



- Prelich, G., C.K. Tan, M. Kostura, M.B. Mathews, A.G. So, K.M. Downey, and B. Stillman. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520.
- Renaudin, J.P., J.H. Doonan, D. Freeman, J. Hashimoto, H. Hirt, D. Inze, T. Jacobs, H. Kouchi, P. Rouze, M. Sauter, A. Savoure, D.A. Sorrell, V. Sundaresan, and J.A. Murray. 1996. Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biol.* 32: 1003-1018.
- Reyes J. J., L. F. Jiménez-G., M. A. González, and J.M. Vázquez R. 1991. Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating seeds. *Seed Sci. Res.* 1: 113-117.
- Riou-Khamlichi, C., M. Menges, J.M. Healy, and J.A.H. Murray. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biol.* 20: 4513-4521.
- Sánchez, M.P., S.H. Gurusinghe, K.J. Bradford, and J.M. Vázquez R. 2005. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56: 515-523.
- Sánchez, M.P., A. Torres, M.B. Boniotti, C. Gutierrez, and J.M. Vázquez R. 2002. PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biol.* 50: 167-175.
- Vázquez, R., J.M., and M.P. Sánchez. 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13: 113-130.