

00562
6
Rey

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE EL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA
BENZIL-ADENINA EN LA ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE
ADN Y LA DIVISION CELULAR, DURANTE LA GERMINACION DE
EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ (*Zea mays* L.).

Tesis presentada por

JORGE REYES JIMENEZ

para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(B I O Q U I M I C A)



MEXICO, D. F., NOVIEMBRE DE 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Resúmen.....	2
Introducción.....	3
La Semilla.....	3
La Germinación.....	4
Algunos Aspectos Bioquímicos de la Germinación.....	4
Síntesis de Proteínas y ARN.....	5
Síntesis de ADN.....	7
Cambios Morfológicos del Núcleo...	8
La División Celular en Células Animales y Células Vegetales. Mecanismo Involucrado en su Regulación.....	9
Acción de los Fitorreguladores.....	11
Eventos Fisiológicos y/o Metabólicos en los que Participan las Citocininas.....	13
Antecedentes.....	15
Hipótesis y Objetivos.....	17
Material.....	18
Métodos.....	21
Resultados.....	25
Artículo: Reyes J., Jiménez-García L. F., González M. A. & Vázquez-Ramos J. M. (1991). Benzyladenine- Stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize. Seed Sci. Res. 1:113-117.....	37
Discusión.....	43
Conclusiones.....	47
Referencias.....	48

RESUMEN

En la presente tesis hemos analizado el efecto que tiene la citocinina sintética bencil-adenina (BA) en el metabolismo del DNA y la división celular durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Los resultados obtenidos muestran que la BA estimula una síntesis de DNA preferencialmente en el núcleo, de los ejes embrionarios. La replicación del DNA, en presencia del fitorregulador, llega a su fin aproximadamente a las 15 horas de iniciada la imbibición y además la presencia de figuras mitóticas es notoria a las 24 horas de imbibición. Asimismo se encontró que la BA promueve una estimulación significativa en la incorporación de [^{32}P] a las proteínas, durante las 3 y 6 horas de iniciada la germinación, junto con ello la actividad de proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} . Dentro de este tipo de proteínas-quinasas se detectó la presencia de la p34^{cdc2} , la cual al analizarla por inmuno-blot muestra un doblete cuando los ejes embrionarios han sido imbibidos por 24 horas en presencia de la BA. Los resultados muestran que la BA modifica la regulación de alguna(s) evento(s) que participan en la división celular, por lo que ésta se presenta a tiempos más cortos que en los ejes embrionarios no tratados con la BA.

I N T R O D U C C I O N

LA SEMILLA

La formación de una semilla es esencial para la superviviencia y dispersión de la mayoría de las especies vegetales (y aún para muchas especies animales que dependen de estas estructuras para su alimentación).

El desarrollo de la semilla se inicia con la fertilización del óvulo, el cual formará el embrión; asimismo se origina una cubierta o testa para la protección de éste. Por otro lado, también se sintetizan reservas alimenticias, las cuales son la consecuencia de la expresión de sólo ciertos genes en esta fase de la embriogénesis (Duré, 1985) que servirán para poder sostener el desarrollo del organismo hasta que es autotrófo (Bewley & Black).

Una vez formada la semilla se inicia una desecación progresiva de los tejidos. El contenido de humedad de la semilla completa cae desde 80-90 % hasta un 10 % en pocos días. La desecación cambia profundamente la actividad de las células. La síntesis de macromoléculas, tales como DNA, RNA y proteínas se detiene; el embrión entra en un estado de mínima actividad metabólica (Bewley & Black).

Para la mayoría de las semillas el secado es el evento terminal en el desarrollo, guiando ésto a una fase de "reposo" metabólico. El factor que se requiere para reanudar la actividad metabólica del organismo y reiniciar su crecimiento y desarrollo es en gran medida la adición de agua.

GERMINACION

Desde el punto de vista bioquímico, la germinación podría definirse como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular (cf. Meléndez, 1990). El agua es esencial para que ocurra la germinación. Cuando la semilla esta en contacto con el agua se lleva a cabo lo que se conoce como imbibición.

La hidratación de los organelos secos (mitocondrias, ribosomas, núcleos, membranas, etc.) en las células de la semilla y de macromoléculas (enzimas, RNAi, RNAm, DNA, etc.) activa las funciones de estos elementos de manera secuencial (Ching, 1972).

Si bien la toma de agua es una condición necesaria, no es suficiente. La germinación es un evento que requiere, además, energía, la cual es proporcionada por los procesos de oxidación, en los que se involucra un intercambio gaseoso, salida de bióxido de carbono y entrada de oxígeno (Mocquot *et al.*, 1981), entre otros muchos eventos metabólicos.

ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION

La capacidad de las células de mantener una homeostasis está basado en la información genética que poseen, la cual es expresada, preservada, replicada y modificada por cuatro mecanismos celulares: i) síntesis de proteínas; ii) reparación del DNA; iii) replicación del DNA y iv) recombinación génica (Alberts *et al.*, 1983).

Además, para el caso de los vegetales, es posible que el control natural de la germinación involucre una interacción de fitorreguladores, tanto inhibidores como promotores de fenómenos metabólicos (Khan, 1967; Adicott, 1972). Por lo tanto los fitorreguladores pueden actuar en concierto para determinar durante el ciclo de vida de la planta respuestas fisiológicas

tales como: tropismo, crecimiento de yemas laterales, división celular, etc. (Khan, 1971). La germinación está sujeta a una muy precisa regulación, la complejidad de lo cual se origina en la interacción de varios factores externos y en las características intrínsecas de la semilla.

Las semillas contienen una gran variedad de enzimas, entre las que se cuentan las relacionadas con los eventos metabólicos que condujeron a este organismo a su madurez. La mayoría de estas enzimas son resistentes a la desecación y se activan tan pronto como la imbibición se lleva a cabo (Simon, 1984).

Durante la germinación, la secuencia de eventos que parece ser común a un gran número de embriones de gramíneas puede dividirse en: i) eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación del DNA; ii) eventos tardíos o secundarios: expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas (Osborne, 1983). Cada evento representa un estado potencial de regulación en el cual un sistema de control puede operar para el buen término de la germinación (Deltour, 1985).

La actividad bioquímica y fisiológica de los ritmos biológicos en las plantas está asociada con varios aspectos genéticos, que intervienen en la regulación temporal de las funciones vitales. El ritmo y síntesis de macromoléculas son aspectos importantes en el desarrollo del embrión durante la germinación (Yadav, 1976).

SINTESIS DE PROTEINAS Y RNA

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla que se encuentra en estado latente, sino que se reinicia cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el RNAm. Se ha observado que los polisomas se encuentran ausentes en las semillas y su estructuración ocurre durante la imbibición (Marcus & Feeley, 1964).

En embriones secos de trigo existen los elementos necesarios para la síntesis de proteínas, la cual se inicia en los primeros minutos después de la imbibición (Marcus *et al.*, 1970; Osborne, 1982; Simon, 1984). En 1979, Cheung y col., mostraron evidencias que indicaban que en ejes embrionarios de trigo, después de 40 minutos de imbibición, la síntesis de proteínas era principalmente por RNAm sintetizado *de novo* más que por el que pudiera estar almacenado (Cheung *et al.*, 1979). Por otro lado existe síntesis de proteínas en los primeros minutos de imbibición de maíz, la cual puede ser debida a RNAm almacenado (Sánchez-Martínez *et al.*, 1986) o a una síntesis *de novo*. En este sentido, existen evidencias que muestran que la síntesis de proteínas *de novo* puede ocurrir en la ausencia de síntesis de RNA, tanto en semillas de algodón (Duré & Waters, 1985) como en embriones de trigo (Chen *et al.*, 1968).

Resultados de este tipo apoyan el concepto de que durante la etapa temprana de la germinación, la síntesis de proteínas está dirigida unicamente por RNAm de vida media larga y que dicha molécula es sintetizada durante la embriogénesis y reactivada como molde sólo después de la imbibición.

Otros estudios muestran que en embriones de trigo algunos de los RNAm almacenados codifican para proteínas de reserva (Mory *et al.*, 1978). Esto podría significar que parte del RNAm almacenado es el restante del que fue traducido durante la maduración de la semilla, pero no fue degradado cuando la semilla se secó. Desde luego que lo anterior no descarta la posibilidad de que dentro de estos RNAm almacenados puedan existir algunos específicos para la germinación.

La pregunta crucial y que permanece sin respuesta, es si estos mensajeros de vida media larga, que están presentes en el embrión seco, juegan un papel controlador en la germinación y a qué tiempo los mensajeros sintetizados *de novo* son esenciales para el desarrollo. Para el caso particular de maíz, parece ser que si es

inhibida la síntesis de proteínas la germinación no se lleva a cabo (Sánchez & Aguilar, 1984).

La síntesis de RNAm es detectada durante las primeras horas de imbibición, tanto en rábano como en trigo. Dommes & Van de Walle (1983), señalan que la mayoría de las moléculas de RNA sintetizadas en la radícula, duante la primera hora de imbibición, corresponden a RNAm.

SINTESIS DE DNA

Parece ser que la síntesis de DNA que primero ocurre durante la germinación temprana de la mayoría de las gramíneas, corresponde a un tipo de síntesis no-programada, la cual se postula que podría ser de tipo reparativo (Osborne, 1984; Galli, 1987; Zaráin *et al.*, 1987). La síntesis de tipo replicativo se inicia horas después (Osborne *et al.*, 1984; Baiza *et al.*, 1989).

La reparación del DNA parece ser de vital importancia durante la germinación temprana, ya que si no se lleva a cabo este evento el embrión no germina, o si lo hace se incrementa la posibilidad de que ocurran aberraciones cromosómicas (Osborne *et al.*, 1984). En este mismo sentido, Gutierrez (1987) señala que la reparación por escisión de uracilos en maíz parece ser un mecanismo finamente regulado en los diferentes tipos celulares del organismo y depende del grado de proliferación y desarrollo celular. Particularmente, células en proliferación como los embriores, parecieran tener una mayor capacidad de reparación del DNA, que las células con una diferenciación terminal o células no proliferativas (rev. por Mitchell & Hartman, 1990).

El tiempo exacto en que comienza la síntesis duplicativa del DNA parece ser muy variable y es dependiente de la especie vegetal, siendo desde 3 hasta 14 horas posteriores a la imbibición (Chean y Osborne, 1970; Mory *et al.*, 1972; Baiza *et al.*, 1989).

CAMBIOS MORFOLOGICOS DEL NUCLEO

La reactivación nuclear durante la germinación es acompañada por modificaciones en la expresión génica (Dowes & Van de Walle, 1983), la cual conlleva el crecimiento y diferenciación de las células embrionarias.

Deltour (1985), señala que en la mayoría de los vegetales, una vez que la maduración de la semilla se ha llevado a cabo, las células se detienen en la fase G₁ del ciclo celular. En general, se postula que el contenido 2C de DNA de los embriones ofrece un menor blanco a los factores que inducen mutaciones, que el contenido de 4C. Pero sin embargo, el contenido 4C, a su vez, podría amortiguar mutaciones, debido a que los genes homólogos darían a la célula una mayor probabilidad de sobrevivencia (Kondrashov & Crow, 1991; Perrot *et al.*, 1991).

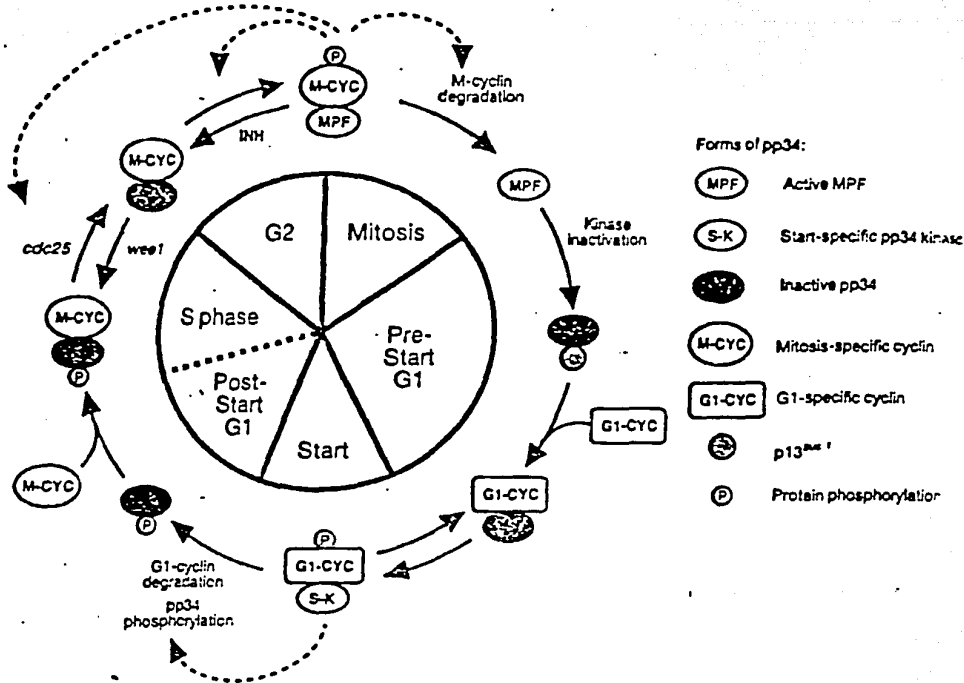
Con respecto a la cromatina, algunos reportes indican que se encuentra altamente condensada en el eje embrionario deshidratado. Durante los primeros momentos de la imbibición se observa una notable dispersión (Sargent & Osborne, 1980), lo cual es interpretado como una desrepresión génica, que se manifiesta en actividad enzimática y síntesis *de novo* de RNAm (Jendrisak, 1980).

Por otro lado, en las semillas de maíz se observan abundantes ribonucleoproteínas (RNPs) nucleoplásmicas, tanto granulares como fibrilares (Deltour *et al.*, 1979; Risueño & Moreno, 1979), las cuales se postula son estructuras que contienen RNAm de vida-larga.

LA DIVISION CELULAR EN CELULAS VEGETALES Y ANIMALES.
MECANISMO INVOLUCRADO EN SU REGULACION

Durante el ciclo de vida de los vegetales, la división celular tiene lugar en las zonas conocidas como meristemas, estas regiones anatómicas del vegetal son las encargadas de conferir el crecimiento celular (Horgan, 1984). Particularmente, la presencia de una concentración óptima de auxinas y citocinas regulan el momento de la división celular, el mecanismo de cómo actúan estos fitorreguladores es poco conocido. Sin embargo, se conoce que la cinasa p34^{cdc2} la cual es una de las principales en la regulación de la división celular en células animales, también se encuentra en los vegetales y su posible papel en este evento podría ser similar en ambos tipos de células.

En células animales, para que la división celular se inicie es necesario que se lleve a cabo una activación de proteínas-kinasas. La cinasa p34^{cdc2} (o su homólogo génico *cdc28*) es una de las principales involucradas en la regulación del ciclo celular junto con una familia de proteínas conocidas como ciclinas. A lo largo del ciclo celular la cantidad de proteína p34^{cdc2} es constante, pero las proteínas ciclinas se acumulan sólo durante la interfase. La ciclina y la proteína p34^{cdc2} deben entonces asociarse para formar un complejo que aún no tiene actividad de cinasa. Este complejo sufre desfosforilación en la proteína p34^{cdc2} y la fosforilación de la ciclina, lo cual conlleva a que la proteína p34^{cdc2} tenga actividad de cinasa. La actividad de la cinasa p80^{cdc25} acelera estos cambios, mientras que el producto del gene *wee1* los retarda. Una vez activada la cinasa p34^{cdc2} se induce la degradación de la ciclina, llevando así a la inactivación de la cinasa p34^{cdc2}, lo cual sucede al final de la metafase, quedándose así hasta el siguiente ciclo de división celular -ver esquema en la siguiente página- (rev. por Draetta, 1990; Nurse, 1990; Freeman and Donoghue, 1991; Broek et al., 1991).



Modelo del ciclo de la proteína-quinasa p34^{cdc2} (círculo externo) durante el ciclo celular. La proteína-quinasa p34^{cdc2} no tiene actividad durante la mayor parte del ciclo celular, pero como resultado de la asociación con ciclinas fosforiladas comienza a hacerse activa como quinasa en el punto STAR y en la mitosis (en esta fase se le denomina Maturation Promoting Factor -MPF-). Estas dos formas activas pueden también estimular su activación y/o inactivación.

Murray A. (Nature 342:14-15, 1989)

ACCION DE FITORREGULADORES

A través de todo su ciclo de vida, las plantas responden a una variedad de señales exógenas y endógenas, tales como: luz, gravedad, temperatura, sustancias microbianas y fitorreguladores, para regular diferentes procesos fisiológicos. Los mecanismos de como estas señales son traducidas y convertidas en una respuesta son poco conocidos.

Una de las interacciones más conocidas son las mediadas por mensajeros químicos: los fitorreguladores. Se conocen seis grupos básicos de fitorreguladores, clasificados de acuerdo a su naturaleza química y a sus efectos fisiológicos: auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno, giberelinas y ácido jasmónico. A continuación se mencionarán algunos eventos en los que participan cada uno de estos fitorreguladores durante la germinación y posterior desarrollo de la planta -a excepción del etileno y el ácido jasmónico, que actúan preferencialmente durante la maduración de frutos y en la senescencia de la planta (rev. por Engrild, 1989)-.

Auxinas. Promueven la elongación celular e intervienen en la diferenciación celular. Se sugiere que las auxinas pueden cambiar los niveles de algunos RNA_m específicos (Theologis, 1986); asimismo, se reporta que inducen cambios en la fosforilación de proteínas en epicotilos de chícharo (Poovaiah *et al.*, 1987). Se han encontrado proteínas que parecieran ser receptores membranales específicos para este fitorregulador (Walker & Zhang, 1990).

Acido Abscísico. Este fitorregulador inhibe el crecimiento (Addicott, 1969); su modo de acción parece ser afectando el metabolismo de ácidos nucleicos (Van Overbeek *et al.*, 1967; Villers, 1968; Walton *et al.*, 1970, Steward and Smith, 1972; Barlow and Pilet, 1984). Su eliminación durante el inicio de la germinación pareciera por lo tanto ser importante para que este evento pueda llevarse a cabo.

Giberelinas. Durante la germinación el embrión sintetiza ácido giberélico (AG) el cual difunde hacia el endospermo hasta alcanzar la capa de aleurona, que responde sintetizando y secretando hacia el endospermo almidonoso diferentes hidrolasas, entre las cuales se encuentra la α -amilasa. Bernal (1984), señala que el AG induce la síntesis *de novo* de ARNm de la α -amilasa y debido a ésto se sintetiza dicha enzima, la cual es necesaria para los fenómenos que conllevan hacia la germinación de trigo.

CITOCININAS. La existencia de sustancias específicas que pueden controlar la división celular en plantas fue postulada desde mucho tiempo antes de que fueran conocidas estas sustancias. Weisner (citado por Horgan) les dio el nombre de controladores químicos de la división celular de plantas.

En 1956, después de 63 años de lo postulado por Weisner, se aisló un factor que induce la división celular al cual se le identificó como 6-(furfurilamino)purina y se le llamó cinetina (Miller, et al., 1956).

En sentido genérico tenemos que las citocininas son definidas como sustancias que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular (Horgan, 1984). A las citocininas se les ha identificado como promotores de la germinación (Van Staden, 1983). Cuando se aplican exógenamente a embriones de *P. vulgaris* se obtienen aumentos de hasta un 25 % en su crecimiento. La germinación y crecimiento de plántulas pueden estar influenciados por más de un fitorregulador y las evidencias sugieren que las citocininas juegan un papel importante en estos eventos (Adicott, - 1972).

EVENTOS FISIOLÓGICOS Y/O METABÓLICOS EN LOS QUE PARTICIPAN LAS CITOCININAS

Morfogenesis

Una de las respuestas más sobresalientes que se observan al agregar citocininas a cultivos *in vitro* de células vegetales, es que promueven la diferenciación; este fenómeno se presenta principalmente cuando las citocininas están en combinación con las auxinas (Skoog and Miller, 1957; Ferré and Torrey 1974, Bopp and Jacob, 1986). Además, promueven la regeneración de ápices de *P. vulgaris* a partir de sus hojas (Malik & Sakena, 1991); la formación de yemas laterales (Vanderkrieken *et al.*, 1991), la organogénesis de los ápices (Smigocki *et al.*, 1988; Smigocki & Owens, 1989; Van Dijck *et al.*, 1988); la inducción floral (Lejeune *et al.*, 1988). En plastidios, las citocininas aceleran la biogénesis del cloroplasto y promueven el incremento de la enzima ribulosa-1, 5-difosfato carboxilasa/oxigenasa (Longo *et al.*, 1979; Lerbs *et al.*, 1985).

Retraso de la senescencia

Las citocininas, aplicadas exógenamente, disminuyen la tasa de degradación de la clorofila y de proteínas, con un concomitante retraso en la senescencia. Se sugiere que una de las formas en que actúan las citocininas, es en la estabilización de los polisomas (Scrivastana, 1969; Berridge and Ralph, 1969). Asimismo, inhibe la acción del ácido jasmónico el cual está involucrado en la senescencia de la planta (rev. por Engrild, 1989).

Citocininas y luz

Existe una interacción entre los eventos promovidos por la luz y aquellos promovidos por citocininas, en algunos casos las citocininas pueden sustituir a la luz durante el control de una gran cantidad de fenómenos biológicos: germinación (Miller, 1958), síntesis de pigmentos (Kohler and Conrad, 1966) y desarrollo de cloroplastos (Parthier, 1979).

Citocininas y Acidos Nucléicos

Finalmente, el tratamiento con citocininas a hojas de frijol y a cotiledones de pepino induce un considerable incremento en el contenido de RNA total (Zwar, 1973; Naito *et al.*, 1978, 1979; Yokoyama *et al.*, 1981). Phillips y Torrey (1973), y Simpson (1977), señalan que en raíces de chícharo, existe un incremento en el contenido de DNA, (que coincide con la división celular), producido por la cinetina. Otros autores también han encontrado un incremento en el contenido de ácidos nucleicos al aplicar exógenamente citocininas a tejidos vegetales (Khan and Heit, 1969; Grierson *et al.*, 1977; Tsuji *et al.*, 1979; Yokoyama *et al.*, 1980). Por otro lado se ha sugerido que las citocininas pueden prevenir el efecto inhibitor del ácido abscísico (Khan, 1967; Sussex *et al.*, 1975) incrementando el contenido de ácidos nucleicos (Albanell *et al.*, 1985). Asimismo, se reporta que existe una relación del contenido del fitorregulador con el ciclo celular (Parker *et al.*, 1978). La acción de auxinas y citocininas es necesaria para que los protoplastos de *Petunia* entren a la fase de síntesis de DNA (Bergounioux *et al.*, 1988). Algunos datos que apoyan este último efecto han sido proporcionados por Nishinari y Syono (1986); estos autores encuentran que se manifiesta un drástico incremento de citocininas en los límites de la fase G₂/M, y otros más ligeros durante la fase S del ciclo celular.

ANTECEDENTES

Como ha sido señalado en la parte introductoria, las citocininas estimulan la síntesis de ácidos nucleicos. En el laboratorio se ha estudiado el efecto que tiene la bencil-adenina (BA, una citocinina sintética) sobre la síntesis de DNA que se lleva a cabo durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de *Zea mays* L. (var. Chalqueño).

Algunos resultados obtenidos hasta el momento muestran que se lleva a cabo un bajo, pero constante, nivel de síntesis de DNA durante las primeras horas de la germinación de maíz (Vázquez-Ramos y López, 1986). Esto pareciera ser un fenómeno común en las gramíneas; de hecho existe evidencia de que esta síntesis puede ser de tipo reparativo (Osborne *et al.*, 1984; Vázquez-Ramos and Osborne, 1986). Además esta síntesis temprana pudiera ser vital para la viabilidad de semillas y ocurre antes de que se inicie la síntesis replicativa (Osborne *et al.*, 1984).

Zaraín y col. (1987), analizaron cualitativamente el tipo de síntesis de DNA que se lleva a cabo durante las primeras horas de la germinación de maíz. En estos estudios encontraron que mientras en embriones de semillas control no existe una síntesis de DNA predominante (no se puede diferenciar entre síntesis de tipo reparativo y replicativo), al imbibir los ejes en presencia de BA se hacen ostensibles dos fenómenos: i) se incrementa la síntesis total de DNA y ii) se detecta principalmente una síntesis de tipo reparativo. Estos mismos estudios se realizaron en ejes γ -irradiados, en los que existe una predominancia de síntesis de DNA de tipo reparativo, en presencia de BA éste tipo de síntesis fue mucho más notable.

Asímismo, se ha encontrado que al imbibir los ejes embrionarios en presencia de BA la actividad de la DNA polimerasa nuclear se activa no sucediendo esto con la actividad de la DNA polimerasa citoplásmica. Este aumento en la actividad pareciera no estar mediado por un aumento en la síntesis *de novo* de dicha enzima, por lo que pareciera ser mediado por una modificación postraducciona l de esta enzima (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990; Ramos, 1990).

HIPOTESIS

Se postula que la BA estimula preferencialmente la síntesis de DNA nuclear y que esto se debe a la modificación covalente de las enzimas del metabolismo del DNA, de tal manera que los eventos del ciclo celular se aceleran y la germinación ocurre en menor tiempo. Asimismo, la actividad de proteínas-cinasas será blanco importante en el mecanismo de acción de la BA.

OBJETIVOS

Determinar si el núcleo es el organelo en donde se estimula preferencialmente la síntesis de DNA por BA.

Determinar si la estimulación de la síntesis de DNA por BA modifica el contenido total del DNA

Evaluar la actividad de la enzima ADP-ribosil polimerasa durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios tratados o no con BA.

Medir si existe un aumento en la actividad de cinasas cuando los ejes embrionarios se imbiben en presencia de BA.

Evaluar si en los ejes embrionarios de maíz existe una cinasa tipo p34^{cdc2} y si su actividad se modifica por la acción de la BA.

MATERIAL

Amortiguador de Imbibición:

Tris-HCl, pH 7.6	50	mM
KCl	50	"
MgCl ₂	10	"
Sacarosa	2	%
Cloranfenicol	10	µg/ml

Amortiguador de Extracción de Núcleos:

Tris-HCl, pH 7.4	15	mM
Sacarosa	0.3	M
cloruro de potasio	10	mM
Cloruro de sodio	15	"
2-mercaptoetanol	15	"
Espermidina	0.50	"

Amortiguador de Ensayo para la ADP-ribosil polimerasa:

Tris-HCl, pH 7.9	50	mM
MgCl ₂	12.5	"
β-mercaptoetanol	5	"
Na ₂ EDTA	1	"
NAD ([³ H]-adenina)	20	Ci/mmol

Amortiguador de Extracción de Proteínas:

Tris-HCl, pH 8	70	mM
EDTA	3	"
2-mercaptoetanol	15	"
DTT	5	"
leupeptina	50	µg/ml

Amortiguador de Dilución:

Tris-HCl, pH 7.5	70	mM
EGTA	5	"
DTT	1	"
NaCl	150	"
β -glicerol-fosfato	80	"
leupeptina	3	μ g/ml

Amortiguador de Ensayo para la Cinasa H1:

Tris-HCl, pH 7.5	70	mM
MgCl ₂	10	"
DTT	1	"
EGTA	5	"
Péptido inhibidor de la cinasa dependiente de AMPc	1	μ M
ATP	20	"
ATP [γ - ³² P]	0.1	μ Ci (3000 Ci/mmol)
Histona H1 tipo III	4	mg/ml

PARA EL INMUNOBLOT:**Amortiguador de Transferencia:**

Tris-HCl, pH 7.4	20	mM
Glicina	150	mM
Metanol	20	%

Amortiguador Salino (TBS):

Tris-HCl, pH 7.4	50	mM
NaCl	0.15	M

Solución de Saturación:

Tween	0.05	% (v/v)
Leche descremada	5	%

Estos reactivos en TBS

Sustrato Insoluble de la Peroxidasas:

4-cloro-1-naftol (Sigma, USA)	22	mg
metanol	11	ml
TBS	33	ml
H ₂ O ₂ al 30 %	44	μl

Solucion Anódica 1:

Tris-HCl, pH 10.4	0.5	M
Metanol	20	% (v/v)

Solucion Anódica 2:

Tris-HCl, pH 10.4	25	mM
Metanol	20	% (v/v)

Solucion Catódica 3:

6-amino-n-hexano-caproico	10	mM
Metanol	20	% (v/v)

PARA INMUNOPRECIPITACION:

Amortiguador A o de Interaccion Ag-Ac:

Tris-HCl, pH 7.5	10	mM
NaCl	150	"
EDTA	1	"
Nonidet P-40	0.05	%

Amortiguador B:

Tris-HCl, pH 7.5	100	mM
NaCl	1	M
EDTA	1	mM
Nonidet P-40	0.05	%
Tritón X-100	0.25	%

METODOS

En todos los experimentos se utilizaron semillas de maíz (var. Chalqueño), las cuales tenían un 95 % de germinación después de 48 horas. Los ejes embrionarios se disectaron manualmente.

Los ejes embrionarios se ponían a crecer en amortiguador de imbibición, el cual contenía, en caso de que los ejes fueran a ser tratados con la bencil-adenina, 10^{-4} M de este fitorregulador.

EXTRACCION DE NUCLEOS (según Cheah & Osborne, 1970). Una vez finalizado el tiempo de imbibición respectivo, los ejes embrionarios se homogeneizan con 8 ml de amortiguador de extracción de nucleos. Posteriormente se filtra a través de 3 capas de Miracloth. Se centrifuga a 800 x g durante 15 minutos. Al término de este tiempo se desecha el sobrenadante y la pastilla obtenida es el extracto nuclear con que se trabaja.

ENSAYO DE ADP-RIBOSILACION (según Grey & Bryant, 1984). Cuarenta μ l del extracto nuclear se resuspenden en 360 μ l del amortiguador de ensayo para la ADP-ribosil polimerasa (volumen total 400 μ l). La mezcla se incuba a 25°C; la reacción se detiene con la adición de un volumen igual de TCA al 10 % (w/v) frío. Una hora después el precipitado se colecta en filtros de papel Whatman GF-C. Los filtros se lavan (x2) con TCA 5 % (w/v) y una vez con etanol. Los filtros son entonces secados y la incorporación de NAD [3 H] se mide en líquido de Bray (1972).

INCORPORACION DE [32 P] A PROTEINAS (según Pérez et al., 1987): Los ejes embrionarios de maíz incubados el tiempo respectivo con o sin BA reciben un pulso de 32 [P]-ortofosfato (11.1 MBq ml^{-1}) durante las últimas 3 horas del tiempo de imbibición. Después de este tiempo, al extracto posribosomal se le agrega protamina 10 % (10 μ l/ml). Las proteínas se precipitan con TCA 10 %. La incorporación de [32 P] se determina por duplicado en alícuotas de

200 μ l en un contador de centelleo, siguiendo el método de Bray (1972).

OBTENCION DE EXTRACTO PARA MEDIR LA CINASA H1 (según Feiler & Jacobs, 1990): Un gramo de ejes embrionarios, previamente imbibidos según el tiempo a determinar, se homogeneizan con 10 volúmenes de amortiguador de extracción de proteínas. Los extractos se filtran a través de 3 capas de Miracloth y posteriormente se hace una ultracentrifugación a 150 000 \times g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se lleva a 35 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las proteínas precipitadas se colectan por centrifugación a 16 000 \times g durante 30 minutos a 4°C. El botón precipitado se resuspende en el amortiguador de dilución, para después dializarlo en contra de este mismo amortiguador. Después de la diálisis, las partículas insolubles se remueven por centrifugación a 16 000 \times g durante 30 minutos a 4°C. Con el extracto proteínico obtenido por este procedimiento se hace el ensayo para la cinasa H1. inmunoprecipitación e inmunoblot.

ENSAYO PARA LA CINASA H1. La mezcla de reacción consiste de 4 μ g de proteína en 20 μ l de amortiguador de diálisis mas 20 μ l de amortiguador de ensayo para la cinasa H1. La mezcla tiene un volumen total de 40 μ l. La reacción se detiene con la adición de TCA al 10 % frío o con 40 μ l de amortiguador de muestra 2X. Cuando se detiene la reacción con amortiguador de muestra se hacen geles de poliacrilamida al 15 %, los cuales se tiñen con azul de Coomassie (Laemmli, 1970), para luego desteñir, secar y posteriormente exponer en una película Cronex (Dupont, USA.) a -70°C durante 4 días.

INMUNOBLOT (según Towbin et al., 1979). Una vez realizada la electroforesis, el gel de acrilamida se lava brevemente en el amortiguador de transferencia. Se recorta una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Scheiller & Schuell) del mismo tamaño del gel que también se lava con amortiguador de transferencia. A

continuación se usa el siguiente procedimiento: 3 piezas de papel 3MM, del mismo tamaño del gel, mojadas en la solución catódica 3, son colocadas en el polo negativo del aparato de electrotransferencia (LKB, Electrophore II); enseguida se coloca el gel, papel de nitrocelulosa (0.45 μ m), 3 piezas de papel 3MM mojadas en la solución anódica 2 y por último 6 piezas de papel 3MM mojadas en la solución anódica 1, la cual queda en el polo positivo del aparato de electrotransferencia. La transferencia se realiza durante una hora a 60 voltios. El filtro con las proteínas transferidas se lava con TBS (15 minutos) con agitación. El filtro se incuba con la solución de saturación durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente y con agitación.

Enseguida se realizan dos lavados con TBS (15 minutos cada uno). Se incuba con el anticuerpo α -PSTAIR (dilución 1:100) en solución de saturación y con agitación durante 14 horas a 4°C. Se hacen dos lavados del filtro con TBS (15 minutos cada uno). Seguido a esto se hace un lavado con TBS que tiene 1 M de NaCl y un lavado con TBS (15 minutos). Se incuba en baño con agitación (2 horas a temperatura ambiente) con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa (1:3000, Bethesda Research Laboratories) en solución de saturación. Se realizan dos lavados con TBS (15 minutos cada uno). Por último, se revela con el sustrato para la peroxidasa. El producto de la reacción (en forma de precipitado azul) sobre la banda de proteína reconocida por el anticuerpo, suele aparecer en aproximadamente un minuto. La reacción se detiene diluyendo con agua. (El anticuerpo α -PSTAIR reconoce específicamente la secuencia polipeptídica EGVPSTAIR EISLLKE, que se ha demostrado estar solamente en la cinasa p34^{cdc2}; es un anticuerpo policlonal obtenido en conejo; fue donado amablemente por el Dr. Jean-Claude Labbé, del CNRS e INSERM, Francia. Su utilización ha sido descrita en varios artículos: Labbé *et al.*, 1988; Labbé *et al.*, 1989; Dorée *et al.*, 1989 Felix *et al.*; 1989; Nishitani *et al.*, 1991).

INMUNOPRECIPITACION (segun Durán & Bach. 1984). A 40 μg de proteína en 400 μl del amortiguador A se les añade el anticuerpo α -PSTAIR (dilución 1:20). Se incuba 14 horas a 4°C con agitación suave. Se añaden 20 μl de proteína A-sefarosa (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc) y se incuba 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se lava 3 veces con amortiguador B y dos con amortiguador A en una microcentrífuga. Una vez hechos los lavados se agrega amortiguador de muestra y el antígeno solubilizado se analiza por electroforesis.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA CINASA H1 EN AMORTIGUADOR QUE CONTIENE LA RESINA DE AFINIDAD CON LA PROTEINA p13^{suc1} (según Peter *et al.*, 1990). A 20 μg de proteína que están en 40 μl de amortiguador de extracción para proteínas se les añade 10 μl de la resina de agarosa que tiene acoplada a la proteína p13^{suc1} (donada amablemente por el Dr. Jean-Claude Lapeé del CNRS e INSERM, Francia); se deja en agitación suave durante 14 horas a 4°C. Al término de este tiempo se microcentrífuga este extracto durante 30 segundos y se toman 40 μl del sobrenadante para hacer el ensayo de la histona H1, tal y como ya ha sido indicado anteriormente. (La proteína p13^{suc1} se une al final de la metafase a la cinasa p34^{cdc2}, por esta afinidad, se le ha utilizado para poder extraer a esta cinasa).

RESULTADOS

En el presente trabajo profundizamos en el estudio del mecanismo por el cual la citocinina bencil-adenina pudiera estar estimulando la síntesis de DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, síntesis que pareciera no ser debida a una síntesis *de novo* de la DNA polimerasa, ya que aun en presencia de inhibidores de la transcripción y/o síntesis de proteínas la estimulación persiste (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990).

En este trabajo se utilizaron técnicas tanto citológicas como bioquímicas. El estudio citológico, que ya se ha publicado y se anexa al final de esta sección, tuvo como fin conocer si la síntesis de DNA estimulada por el fitorregulador se localizaba preferencialmente en un organelo específico. A continuación se resumirán estos resultados brevemente, lo cual servirá como introducción a la siguiente parte del trabajo. (La secuencia de figuras de que consta toda la tesis se numerará de la siguiente manera: las figuras 1-3 junto con la tabla I corresponden a los resultados del artículo, la numeración de las figuras y tablas de que consta el resto del manuscrito comienzan a partir del No. 4 y II, respectivamente).

Conforme transcurre el tiempo de imbibición de ejes embrionarios embebidos con BA (0-6 h), las autorradiografías obtenidas muestran que la marca de timidina [3 H] se incorpora hacia la región nuclear (Fig. 1 D y F), mientras que en ejes embrionarios no tratados con BA esto no sucede (Fig. 1 C y E). Este resultado sugiere que los ejes embrionarios tratados con BA realizan una gran reparación del DNA o bien se iniciaba la fase S (replicación del DNA) del ciclo celular. Las mediciones espectrofotométricas mostraron en los ejes tratados con BA la existencia de un aumento en la cantidad de DNA nuclear, la cual se duplica a las 15 horas de imbibición (Fig. 2), dato que sugiere que el DNA se ha replicado; mientras que para ejes embrionarios no tratados, la duplicación ocurre horas después. Con estos resultados se podía suponer que las células de los ejes tratados con el fitorregulador tenderían a

dividirse en un tiempo mas corto que las de los ejes no tratados. La Fig. 3 muestra que efectivamente a cualquier tiempo que se mide el índice mitótico, los ejes tratados con la BA muestran mayor número de figuras mitóticas (veáse también la Tabla I). Los anteriores resultados muestran que la BA está interviniendo en alguna(s) vía(s) que están involucradas en la regulación del ciclo celular. Hasta aqui los resultados del artículo que se anexa.

Asimismo, como se señaló al inicio, la estimulación enzimática de la DNA polimerasa pareciera ser debida a una modificación covalente de la enzima. La ADP-ribosil Polimerasa es una enzima nuclear que se ha encontrado que está activa principalmente durante eventos del metabolismo del DNA, su actividad se manifiesta por la ADP-ribosilacion de varias enzimas que están involucradas en la reparación y replicación del DNA (Durkacz *et al.*, 1980; Adamietz & Rudolph, 1984; Grey & Bryant, 1984; Ferro & Baldomero, 1984; Greer & Kaplan, 1986; Dai *et al.*, 1987; Krupitza & Cerutti, 1989; Boulikas, 1989; Alvarez-González & Althaus, 1989; Ménissier-de Murcia *et al.*, 1989; Boulikas, 1990; Gradwohl *et al.*, 1990). Debido a esto decidimos evaluar la actividad de la ADP-ribosil polimerasa durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz, tratados o no con la BA.

En la Fig. 4 se observa la cinética enzimática realizada para el ensayo de la ADP-ribosil polimerasa, la cual muestra un comportamiento lineal hasta los 8 minutos de reacción. Con este ensayo se evaluó la actividad de la ADP-ribosil Polimerasa a diferentes tiempos de imbibición. La Tabla II muestra que cuando los ejes embrionarios son imbibidos en presencia de BA, los extractos muestran una mayor actividad de la ADP-ribosil Polimerasa a las 6 y 9 horas de imbibición (comparada con el control sin BA), disminuyendo la actividad a las 12 horas, incluso por debajo del control. Estos datos sugieren una gran actividad de la ADP-ribosil polimerasa que podría estar relacionada con la reparación y/o la replicación del DNA que ocurre a estos tiempos particulares (-BA, 12 h; +BA 6 y 9 h) en ambos tipos de ejes.

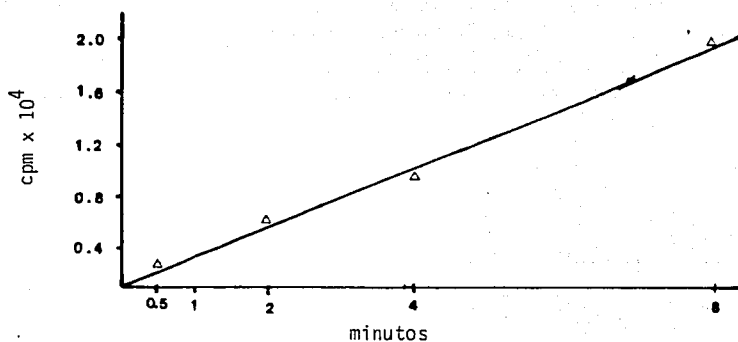


Fig. 4. Ensayo de la Enzima ADP-ribosil Polimerasa. Alícuotas de un extracto nuclear se incuban a 25 °C a diferentes tiempos en el amortiguador de ensayo para la ADP-ribosil Polimerasa. La reacción se detiene con TCA al 10 %; después de una hora el precipitado se filtra - en papel Whatman GF-C #1 y se mide la incorporación de ADP (³H-adenina).

Tabla II. Actividad Específica de la ADP- ribosil Polimerasa de Ejes embrionarios de maíz, tratados o no con BA.

Horas de imbibición	Actividad Específica (\pm DS*)		Estimulación por BA (%)
	(cpm/ μ g prot.)		
	- BA	+ BA	
6	3.16 \pm 0.79	7.14 \pm 1.31	139
9	6.56 \pm 0.58	7.68 \pm 1.60	17
12	14.90 \pm 1.59	6.05 \pm 0.46	--

* n=3

Por otra parte, actualmente se conoce que uno de los mecanismos que operan para que el ciclo celular se lleve a cabo está mediado por un aumento en la fosforilación de varias proteínas (Dunphy & Newport, 1988; Cyert & Thorner, 1989; Criops-Wolfman *et al.* 1989; Maller, 1990; Trewavas & Blowers, 1990; Freeman & Donoghue, 1991). Por tal motivo, evaluamos el efecto que tiene la BA sobre la actividad de las proteínas-quinasas presentes durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

La Tabla III muestra el efecto que tiene la BA sobre la incorporación de [32 P] a proteínas a 3 y 6 horas de imbibición. Se observa que en ambos tiempos existe un aumento significativo en la incorporación de este isótopo.

Tabla III. Estimulación de la incorporación de 32 [P] a proteínas de ejes embrionarios imbibidos en presencia de BA.

Horas de imbibición	Incremento (%) \pm DS cpm/ μ g prot.
3	37 \pm 8 *
6	82 \pm 14

* n=3

Con el objeto de conocer si dentro de este conjunto de proteínas-quinasas estimuladas se encontraban las independientes de calcio, las cuales se sugiere están participando en los eventos que regulan la división celular, se usó la metodología reportada por Feiler & Jacobs (1990). Para tal objetivo se probó si los extractos obtenidos tenían actividad de proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} . La Fig. 5 muestra la cinética enzimática de cinasas independientes de Ca^{2+} , que utiliza como sustrato la histona H1. La cinética muestra un comportamiento lineal hasta los 10 minutos.

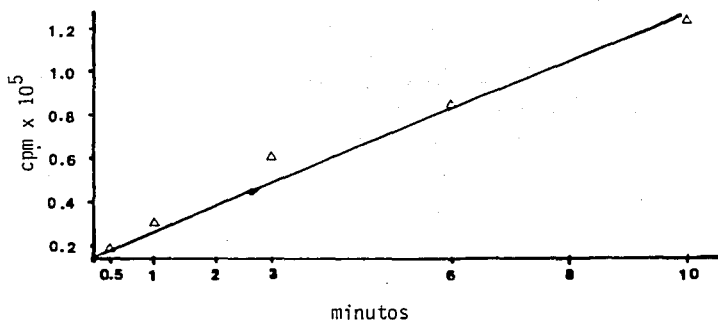


Fig. 5. Cinética de las proteínas-quinasas independientes de Calcio. Una alícuota de ejes embrionarios homogeneizados en presencia de -- EGTA se incuban a 37 °C a diferentes tiempos en el amortiguador de -- ensayo para la cinasa H1. La reacción se detiene con TCA al 10 %. -- El precipitado se filtra en papel Whatman GF_C #1 para después medir la incorporación de (³²P).

Además, se evaluó si la actividad de proteínas-quinasa era modificada por el hecho de haber homogeneizado los ejes embrionarios con o sin EGTA. Para esto lo que se hizo fue obtener extractos proteínicos de ejes embrionarios que han sido homogeneizados con y sin EGTA; en este último caso el reactivo se agrega al momento de realizar el ensayo. Al agregar el EGTA durante la homogeneización el Ca^{2+} es quelado y las proteínas-quinasas que son dependientes de este ión divalente tendrán una mínima actividad: por lo tanto sólo se cuantifica la población de enzimas independientes de Ca^{2+} .

Como se señala en la Fig. 6 y Tabla IV, los extractos obtenidos con EGTA tienen una menor actividad de cinasas comparado con los extractos obtenidos en ausencia del reactivo quelante, siendo esto un indicio de que se eliminan diversas proteínas-quinasas y quedan preferencialmente las independientes de Ca^{2+} . Más importante aún, se aprecia que en las muestras que tienen BA existe una mayor actividad de proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} (Tabla IV).

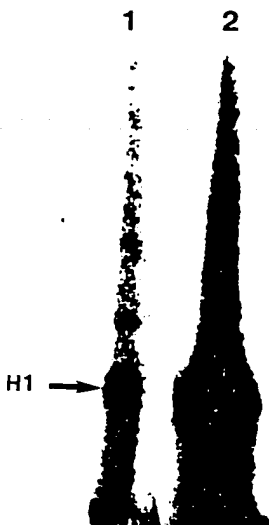


Fig. 6. Autorradiografía de un gel de poli-acrilamida. Las muestras obtenidas después de hacer el ensayo para proteínas-quinasas independientes de calcio son corridas. Se utiliza como sustrato exógeno la histona H1. Carril 1. Muestra obtenida homogeneizando los ejes embrionarios en presencia de EGTA. Carril 2. Muestra obtenida homogeneizando los ejes embrionarios sin EGTA.

Así, con este último experimento observamos que BA está estimulando la actividad de proteínas-quinasas totales y, de manera interesante, la actividad de proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} . Este último tipo de proteínas-quinasas parecen ser las responsables de regular eventos del ciclo celular (rev. por Cross, 1989; Lohka, 1989). Por tal motivo, realizamos experimentos para conocer si las proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} tienen variaciones en su actividad a tiempos de imbibición mas largos, que es cuando se lleva a cabo la división celular (Fig. 3).

La Tabla V muestra que la actividad de las proteínas-kinasa es notoriamente mayor en los ejes embrionarios imbibidos durante 24 horas con BA. A este tiempo, como se aprecia en la Fig. 3, existe una mayor cantidad de figuras mitóticas para los ejes embrionarios tratados con BA.

TABLA V. Ensayo de actividad de la proteína-kinasa independiente de Ca^{2+} de extractos obtenidos en presencia de EGTA. La reacción se detuvo a los 10 minutos.

Horas de imbibición	Actividad Especifica (cpm/ μg prot.) \pm DS	
	- BA	+ BA
15	9638 \pm 1892*	12255 \pm 1482*
24	32232 \pm 2339	56702 \pm 4128

* n=3

Hasta aquí los experimentos realizados indican la estimulación de proteínas-quinasas independientes de Ca^{2+} ; dentro de este conjunto de cinasas se encuentra la $p34^{cdc2}$, enzima que en células animales es una de las principales en la regulación del ciclo celular. Para probar la presencia de esta enzima en nuestro ensayo enzimático realizamos el siguiente experimento: se agregó una resina de afinidad (agarosa acoplada con la proteína $p13^{suc1}$, ver métodos) a un extracto proteínico de ejes embrionarios imbibidos por 15 horas, se dejó en incubación y luego se tomó una alícuota para probar si existía fosforilación en la histona H1 en el ensayo (ver métodos).

La Fig. 7 muestra que cuando un extracto proteínico obtenido en presencia de EGTA se preincuba con la agarosa que tiene asociada la proteína $p13^{suc1}$ y posteriormente se toma una alícuota para hacer el ensayo hacia la histona H1 se observa que la fosforilación hacia esta histona disminuye considerablemente (carril 1), no sucediendo esto en el extracto al que no se le agregó la resina (carril 2). Indicando estos resultados que existe una actividad de cinasa hacia la histona H1 que disminuye cuando se elimina la cinasa tipo $p34^{cdc2}$.



Fig. 7. Autorradiografía de un gel de poli-acrilamida en donde se cargan las muestras - de extractos proteínicos que fueron preincubados con la resina de agarosa que tiene asociada la proteína $p13^{suc1}$ y a los que después se les hizo el ensayo para la cinasa H1. Carril 1. Extracto preincubado con la resina de agarosa- $p13^{suc1}$. Carril 2. Extracto preincubado sin la resina de agarosa- $p13^{suc1}$.

Para reconfirmar la presencia de la proteína p34^{cdc2} se realizó un inmuno-blot de los ejes embrionarios imbibidos durante 24 horas con el anticuerpo α -PSTAIR, el cual reconoce específicamente a esta proteína-quinasa. En la Fig. 8 se aprecia que el anticuerpo sólo reconoce una banda de 34 Kd. el cual es el peso molecular reportado para la p34^{cdc2} de todos los organismos eucariotes hasta el momento estudiados (rev. por Minshull *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1989).

Así, los ejes embrionarios tienen la proteína-quinasa independiente de Ca²⁺, p34^{cdc2} (ser/tre). Más aún, en la Fig. 9 se observa un inmuno-blot de muestras de diferentes tiempos de imbibición. Se logra apreciar que las muestras, independientemente del tiempo de imbibición (6 y 24 horas), tienen el mismo corrimiento electroforético de la proteína tipo p34^{cdc2} de maíz y además se logra apreciar en todas ellas otra banda, la cual es mucho más conspicua en los ejes embrionarios que han sido incubados durante 24 horas en presencia del fitorregulador. El doblete que se detecta mediante esta metodología, según los datos de la literatura, pudiera corresponder a la forma activa de la quinasa p34^{cdc2} (Solomon *et al.*, 1990; Nishitani *et al.*, 1991).

Este resultado pareciera indicar que la quinasa tipo p34^{cdc2} de maíz alcanza su mayor actividad a las 24 horas de imbibición cuando se incuban los ejes en presencia de BA; tiempo al cual también observamos que las células de los ejes embrionarios de maíz muestran un mayor índice mitótico (Fig. 3).

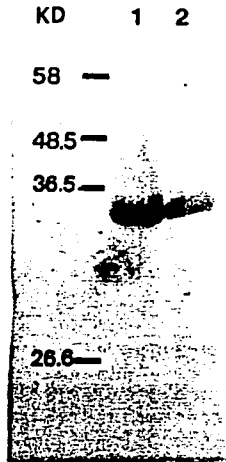


Fig. 8. Inmuno-blot de extracto proteico obtenido de ejes embrionarios imbibidos 24 horas.

El inmuno-blot se realizo con el anticuerpo α -PSTAIR.

Carril 1. Extracto total de proteinas.

Carril 2. Inmunoprecipitacion.

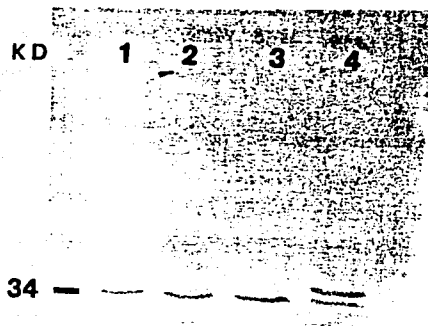


Fig. 9. Inmuno-blot de extractos de ejes embrionarios imbibidos 6 y 24 horas con o sin BA.

El inmuno-blot se realizó con el anticuerpo α -PSTAIR

Carril 1. 6 horas -BA

Carril 2. 6 horas +BA

Carril 3. 24 horas -BA

Carril 4. 24 horas +BA

Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize

J. Reyes¹, L. F. Jiménez-García², M. A. González² and J. M. Vázquez-Ramos^{1*}

¹ Depto de Bioquímica Vegetal, División de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química, and ² Lab. Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. 04510

Abstract

We have studied by means of cytology and autoradiography the effect of benzyladenine (BA, a synthetic cytokinin) on DNA metabolism during early maize germination. The data indicate that BA stimulates nuclear DNA replication. The doubling of the amount of nuclear DNA in BA-treated axes occurs earlier than in non-treated axes, and there is a three-fold increase in the mitotic index at 24 h of germination. These results provide further corroboration for the suggestion that the stimulation of DNA synthesis observed relates to a nuclear replicative type of synthesis. Possible mechanisms of action of BA are discussed.

Keywords: benzyladenine, cell division, DNA synthesis, germination, maize, *Zea mays*

Introduction

Phytohormones or plant hormones are substances considered to have fundamental roles in the regulation of the life cycle of plants (Trewavas, 1981). The cytokinins are one class of phytohormones whose role was first described as promotion of cell division (Miller *et al.*, 1956). Further studies have shown that, among other events, cytokinins stimulate nucleic acid synthesis: the synthetic cytokinin benzyladenine stimulates RNA synthesis in *Phaseolus vulgaris* (Fletcher, 1969; Naito *et al.*, 1978; Yokoyama *et al.*, 1980) and DNA synthesis in *Phaseolus vulgaris* and *Citrus vulgaris* (Yokoyama *et al.*, 1980, 1981; Galli, 1984).

We have been investigating the effect of benzyladenine (BA) on DNA metabolism during maize germination. DNA synthesis is enhanced by BA from the beginning of germination. The stimulation produces

a peak of DNA synthesis about 6 h following the start of germination (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). The enhanced DNA synthesis during the earlier 0-3 h period appears to be mainly of a repair type (Zarain *et al.*, 1987). DNA polymerase activity is also stimulated by BA, and this polymerase activity is located in nuclei (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). Recently, Houssa *et al.* (1990), reported a possible stimulation of replication origins in *Sinapis* and shortening of DNA replication by added cytokinins.

We have investigated the mechanism of stimulation of DNA metabolism by BA, by means of cytological and autoradiographic techniques in order to determine intracellular location of the DNA synthesis promoted by BA and also its effect on cell division during maize germination. The results of this study are presented here.

Material and methods

Seeds

Zea mays (var. Chalqueño) seeds were kindly provided by Productora Nacional de Semillas (Pro-nase), Coyoacán, México D.F. The seed lot had a percentage germination of 95% after 48 h. Maize embryo axes were hand dissected and, if not used immediately, were maintained in a desiccated state over solid CaCl₂ at 4°C.

Chemicals

Benzyladenine, pectinase, RNase A, chloramphenicol, and Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. (Methyl-³H) thymidine (85-90 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear, Boston, MA, USA. Glutaraldehyde was obtained from Polysciences, Ilford L4 emulsion was obtained from Ilford Co., England. Glycide ether 100 was obtained from Merck, USA.

* Correspondence

Irradiation of embryo axes

Embryonic axes in plastic Petri dishes were exposed to γ -irradiation from a cobalt source in a Gamma Cell 200 (AECL) irradiator for a period of 120 min to achieve an irradiation dose of 1000 Gray.

Imbibition of maize axes

Maize axes were disinfected using 0.5% NaClO for 1 min, washed four times with sterile distilled water and incubated at 25°C between two sterile discs of Whatman paper No. 1, for different time periods. The sterile imbibition buffer contained 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% sucrose, 10 μ g/ml chloramphenicol and when needed, benzyl adenine (1×10^{-4} M) and/or (3 H) thymidine (50 μ Ci/ml). The (3 H) thymidine was added to the imbibition buffer during 3 h-pulses from 0–3 and 3–6 h. At the end of each incubation period, the axes were fixed by submerging them in a mixture of ethanol–acetic acid (3:1) for 24 h at room temperature, passed to 70% ethanol and kept at 4°C until dissection (Sharma and Sharma, 1980). Meristematic regions of primary root (radicular meristem) and mesocotyl (apical meristem) were dissected from the axes under a light microscope (Baiza *et al.*, 1989). Samples were prepared as described below.

Microspectrophotometry

Samples were fixed in 70% ethanol for 30 min at room temperature. They were then treated with 5% pectinase in 0.16 M phosphate buffer at pH 7.2 for 12 h at 37°C and rinsed three times with the same buffer. Squashes were prepared and digested with 100 μ g/ml RNase A for 12 h at 37°C. After this treatment, we used a procedure for DNA staining based on enzymatic digestion followed by an assay for basophilic structures as described by Smetana (1967) with some modifications. Comparative estimations of the DNA content per nucleus were carried out in 1% acidic (pH 1.6) toluidine blue-stained preparations. DNA content of each anaphase group of chromosomes (2C) was similar to the DNA content at 3 h of imbibition.

Densitometric measurements were made under standardized conditions, in a standard Zeiss microscope with optovar (2 \times), coupled with an SF photometer and electronic control PMT. A circular diaphragm of 0.63 mm in diameter was used to cover the whole area of the nucleus. Observations were carried out at a magnification of $\times 100$ using immersion oil, with the illuminating lamp powered with regulated current. A red filter was also used (maximal transmittance at 620 nm) complementary to the blue staining (maximal absorbance at 625 nm). The inverse of the transmittance in each nucleus was plotted as an estimation of the amount of DNA in arbitrary relative units.

In order to test the specificity of the stain for DNA under these conditions, we treated some cells with alcoholic acidic toluidine blue after RNase digestions. This alcoholic dye stains RNA specifically. The absence of colour after the digestion indicates that no RNA was present.

Autoradiography

Samples for light microscopy autoradiography were prepared as for electron microscopy: they were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.16 M phosphate buffer at pH 7.2 for 2 h at room temperature, then dehydrated in gradual concentrations of ethyl alcohol followed by propylene oxide and embedded in glycidic ether 100. Semithin sections (approx. 200 nm thick) were obtained. Ilford L4 emulsion was applied on to slides and developed with D-19 (Kodak) after 1 month of exposure. After development, toluidine blue–borax was used for general staining (Vázquez-Nin *et al.*, 1986).

Mitotic index

For mitotic index determinations, samples were imbibed for 10, 15 and 24 h in the presence of BA as described above. Controls had no BA. Semithin sections of material fixed and embedded for electron microscopy, stained with toluidine blue–borax, were used. A total of 3000 cells in three different experiments were examined. Mitotic figures were observed at $\times 100$.

Results

Benzyladenine (BA) stimulates DNA synthesis during early maize germination (Zarain *et al.*, 1987; Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). Maize embryo axes were imbibed for different periods in the presence or absence of BA and (3 H) thymidine; root meristems were sliced and processed for autoradiography to determine the cellular localization of the label. γ -Irradiated axes were also BA-treated for the same lengths of time for comparison. In the latter treatment, a DNA repair process would be expected to occur during the first hours of germination. Figure 1 shows the results obtained. Little label is found in 3 h-imbibed untreated axes (5.1 ± 0.7 grains) and this is located mainly in the cytoplasm (Fig. 1A); 3 h-imbibed, BA-treated axes showed slightly more label (7.8 ± 0.7 grains), some of which appeared in the nuclear region (Fig. 1B); for γ -irradiated axes we obtained similar results (data not shown). At 6 h, axes with no BA, whether irradiated or not, showed more label than at 3 h and it was also mainly located in the cytoplasm (Figs 1C and 1E); however, in BA-treated axes (irradiated or not) label is located in the nuclei (Fig. 1D and 1F, arrowheads) and in the non-

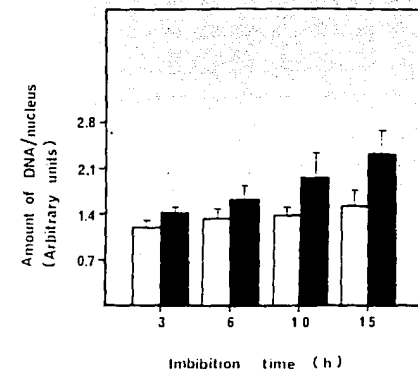


Figure 2. Microspectrophotometric measurements of the amount of DNA per nucleus in maize axes at different times of imbibition with (black bars) or without (white bars) benzyladenine. The arbitrary units were estimated as the inverse of the transmittance per nucleus. There is a progressive increase in the amount of DNA in BA-treated nuclei which doubles at 15 h preparing the cells to enter mitosis. Bars represent the average of DNA measured in 300 nuclei per sample (\pm S.D.). Numbers are without with BA respectively: 3 h, 1.2 ± 0.06 and 1.4 ± 0.09 ; 6 h, 1.3 ± 0.12 and 1.6 ± 0.13 ; 10 h, 1.3 ± 0.13 and 2.0 ± 0.4 ; 15 h, 1.5 ± 0.25 and 2.3 ± 0.36 .

irradiated samples (1D) the nucleoli seem to be heavily labelled (arrows). It has been reported that BA stimulates a repair-type DNA synthesis in 3 h-imbibed maize axes both γ -irradiated and untreated (Zarain *et al.*, 1987). Whereas nuclear label in Figs 1C and 1E would be suggestive of repair-type labelling, Figs 1D and 1F show heavy labelling, more indicative of replicative rather than repair-type synthesis.

The amount of DNA present in 3, 6, 10 and 15 h imbibed axes with/without BA was estimated (Fig. 2). It was found that there is a progressive increase in

Figure 1. Autoradiography of maize axes imbibed for 0-3 or 0-6 h in the presence/absence of benzyladenine (BA). Maize axes received 3 h (methyl- 3 H) thymidine-pulses in the periods of 0-3 (A-B) or 3-6 h (C-F) of imbibition in the presence (B, D, F) or absence (A, C, E) of BA. Control axes (A, B, C, D); γ -irradiated axes (E, F). In controls A and C, label is poor and distributed throughout the cell. When BA is present, B and D, label concentrates mainly in the nucleus and at 6 h (D) there appears to be label in the nucleoli (arrows). A semitangential section of a nucleus shows label in the nucleoplasm (arrowhead). When γ -irradiated axes are incubated in the presence of BA (F) label is localized mainly in the nucleus (semitangential section in F); compare to that of D (arrowheads). Bar = 5 μ m.

the amount of DNA in the cells of BA-treated axes so that at 15 h the DNA content of the cells had doubled suggesting the presence of cells in the G₂ phase of the cell cycle before mitosis. It is important to note that at 3 h of imbibition maize cells have been found predominantly in the G₁ phase of the cell cycle (Deltour, 1985); we have also found that the nuclear DNA content at 3 h is similar to that of half-anaphases (2C) or early G₁ cells (results not shown). Axes imbibed for 15 h without BA have cells which exhibit only a small increase in DNA content, and 4C values are reached by 24 h (not shown, Baiza *et al.*, 1989). These results were further corroborated by measuring the mitotic index of cells of axes imbibed with/without BA for 10, 15 and 24 h (Fig. 3).

Prophases start to appear about 10 h following the start of imbibition (as determined by chromatin condensation and the absence of nucleoli) in both with/without BA imbibed axes but there is always a higher proportion when BA is present. By 24 h there are more than 3 times as many mitotic figures in BA treated axes than without BA; the frequency of the various mitotic stages is presented in Table 1. Most mitotic cells are in prophase and prometaphase, but a few prometaphases and telophases can be seen. Mostly interphase and some prophase cells are observed in the control. Similar results to those described above were obtained when mesocotyl meristems were used.

Discussion

Benzyladenine stimulates DNA synthesis in germinating seeds (Galli, 1984; Zarain *et al.*, 1987) and it has been proposed that this synthesis is either a repair

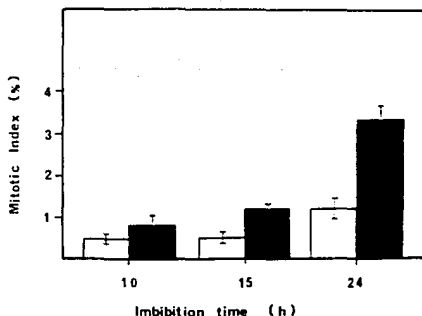


Figure 3. Mitotic index in maize axes at difference times of imbibition in the presence (black bars) or absence (white bars) of BA. Numbers (with S.D.) are with/without BA respectively: 10 h, 0.8 ± 0.2 and 0.5 ± 0.1 ; 15 h, 1.2 ± 0.1 and 0.5 ± 0.1 ; 24 h, 3.4 ± 0.4 and 1.2 ± 0.3 .

Table 1. Frequency of mitotic figures in 24 h imbibed maize embryo axes (BA, benzyladenine)

Phase	No. of cells	
	- BA	+ BA
Interphase	2964	2886
Prophase	36	72
Prometaphase	0	27
Metaphase	0	6
Anaphase	0	0
Telophase	0	9
Mitotic index	1.2%	3.95%

type (Zarain *et al.*, 1987) or an amplification type (Galli, 1984). The results presented in this paper suggest that BA also promotes the start of replicative DNA synthesis at earlier times during maize germination than in control seeds, which start much later (by 15 h, Baiza *et al.*, 1989). The nuclei of cells of 6 h BA-treated axes show heavy labelling (some of it apparently in nucleoli), whereas non-BA treated tissues show scatter labelling throughout the cells. In γ -irradiated axes there is also label present but it is located throughout the cell whilst when BA is present the label appears over the nuclei, although apparently not over nucleoli. At 3 h, the label over nuclei of BA-treated axes might represent a repair-type synthesis since it is very similar to that found in γ -irradiated axes with/without BA (Zarain *et al.*, 1987). γ -Irradiated axes were used since in these axes it is expected to find an increase repair synthesis at times when no replication takes place in maize (0–6 h, Baiza *et al.*, 1989). Germination percentage in these axes decreases with time of imbibition due to the general damage caused by γ -irradiation, although our evidence shows that BA increases the germination capacity of γ -irradiated axes by 3–5 fold (Zarain *et al.*, 1987).

The comparative estimation of nuclear DNA per cell indicates that by 15 h, cells of BA-treated axes have doubled their original amount of DNA suggesting that the cells are now in the G₂ phase and are ready for mitosis. Support for this suggestion is given by the increase in the number of mitotic figures at 15 h and especially at 24 h when axes are imbibed in the presence of BA, with as many as three times as many mitotic figures present as in non-BA treated axes at 24 h.

We have reported that BA stimulates not only DNA synthesis but also nuclear DNA polymerase activity during maize germination (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). This stimulation is apparently not due to synthesis of the enzyme but to the synthesis or stimulation of another factor that then stimulates polymerase activity. The increase in these activities might result in the initiation of the cell cycle events at earlier times than in control seeds. Perhaps the G1

stage of cell cycle is shortened since this stage has been considered to be a regulatory point (Pardee, 1989). It is tempting to speculate that BA promotes the activity of proteins that modulate the cell cycle, especially since the presence of cell cycle controlling kinases such as CDC2 have been recently demonstrated in several plant systems (John *et al.*, 1990). We are currently pursuing investigations into these proteins in maize.

(CONACYT grants 880374 and 903713)

References

- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* **135**, 416-421.
- Deltour, R. (1985) Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. *Journal of Cell Science* **75**, 43-48.
- Fletcher, R.A. (1969) Retardation of leaf senescence by BA in intact bean plants. *Planta* **89**, 1-8.
- Galli, G.M. (1984) Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and BA. *Planta* **160**, 193-199.
- Houssa, C., Jacquard, A., and Bernier, G. (1990) Activation of replicon origins as a possible target for cytokinins in shoot meristems of *Sinapis*. *Planta* **181**, 324-326.
- John P.C.L., Sek, F.K. and Lee, M.G. (1989) A homolog of cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**, 1185-1193.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okomura, F.S., Saltz, M.H. and Strong, F.M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of American Chemical Society* **78**, 1345-1350.
- Naito, K., Tsuji, H. and Hatekeyama, I. (1978) Effect of BA on DNA, RNA, protein, and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to BA according to leaf age. *Physiologia Plantarum* **43**, 367-371.
- Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
- Sharma, J.K. and Sharma, A. (1980) *Chromosomes techniques. Theory and practice*, pp 107-109. Butterworths, London.
- Smetana, K. (1967) Basic histochemical and cytochemical methods, pp 364-443 in Busch, H. (Ed.) *Methods in cancer research*, Vol. II. Academic Press, New York.
- Trewavas, A. (1981) How do plant growth substances work? *Plant Cell and Environment* **4**, 203-228.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Zavala, G., Jiménez-García, L.F., González, M.A. and Parra, R. (1986) Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anatomica* **126**, 141-146.
- Vázquez-Ramos, J.M. and Reyes, J.J. (1990) Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyl adenine during early germination of maize axes. *Canadian Journal of Botany* **68**, 2590-2594.
- Yokoyama, M., Naito, K. and Susuki, H. (1980) Effect of BA on chlorophyll, DNA, RNA and protein content of attached young bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *Annals of Botany* **45**, 649-653.
- Yokoyama, M., Naito, K. and Susuki, H. (1981) BA-enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant Cell Physiology* **22**, 623-627.
- Zarain, M.H., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J.M. (1987) Effect of BA on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Research* **181**, 103-110.

Received: August 23, 1990; Accepted: February 28, 1991

© C-A-B International, 1991

DISCUSION

A partir de que en 1956 se postula a las citocininas como promotoras de la división celular (Miller *et al.*, 1956), una serie de evidencias han probado que este fitorregulador está, además, interviniendo en una diversidad de eventos metabólicos y/o fisiológicos durante el ciclo vital de los vegetales.

En uno de los primeros trabajos realizados con citocininas se señaló que existía un incremento en el contenido de DNA al agregar este fitorregulador a tejido medular de *N. tabacum* (Das *et al.*, 1956). Investigaciones posteriores indicaron que se manifestaba un incremento tanto en el contenido de ARN como en el de DNA al añadir las citocininas a diferentes tejidos vegetales (Mikulovitch & Kulaeva, 1977; Galli, 1984; Naito *et al.*, 1978; Tsuji, 1979; Yokoyama *et al.*, 1980, 1981).

Si bien es claro que se incrementa el contenido de DNA al agregar citocininas, no se sabe con precisión a qué puede corresponder este efecto (rev. por Vázquez-Ramos & Reyes, 1989). Zarain y col. (1987) encontraron que la BA estimula preferencialmente la síntesis de DNA de tipo reparativo en ejes embrionarios de maíz a 3 horas después de la imbibición. En concordancia con los datos anteriores Galli (1984) señala que existe un incremento en la síntesis de DNA nuclear en cotiledones de sandía cuando se agrega la BA, síntesis que no corresponde a una de tipo replicativo. Además posteriores estudios de nuestro grupo de trabajo señalan que se incrementa la síntesis de DNA así como la actividad de la DNA polimerasa nuclear.

En el presente trabajo, con los estudios citológicos comprobamos que la BA estimula durante las primeras horas de la germinación (6 h), la incorporación de timidina $^3\text{[H]}$ hacia el núcleo, lo cual posteriormente promueve división celular del tejido meristemático (artículo anexo); resultados similares han sido obtenidos en meristemos de *Sinapis* (Houssa *et al.*, 1990). Los anteriores resultados comorueban que la BA está promoviendo la división celular; sin embargo, como ha sido señalado anteriormente, la estimulación temprana en la síntesis de DNA pareciera no ser debida a síntesis de nueva polimerasa (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990). Con la idea de profundizar en el posible mecanismo que pudiera estar involucrado en este fenómeno decidimos evaluar la actividad de enzimas que modifican covalentemente a proteínas que intervienen en el metabolismo del DNA.

Una de tales enzimas es la ADP-Ribosil polimerasa. Encontramos que en los ejes embrionarios imbibidos en presencia de BA, la actividad de la ADP-ribosil polimerasa muestra mayor actividad, con respecto a la del control. Esto podría sugerir que una alta actividad de la ADP-ribosil Polimerasa a las 6 horas sería indicativa de eventos que tienen que ver con la reparación y/o replicación del DNA. Para los ejes embrionarios no tratados, la mayor actividad de la ADP-ribosil Polimerasa es a las 12 horas lo que indicaría que la síntesis replicativa de DNA se inicia más tarde. Resultados similares a lo aquí señalado han sido descritos por Grey & Bryant (1984) quienes trabajando con chícharo analizaron el comportamiento de la ADP-ribosil polimerasa durante la germinación.

Asimismo, es conocido que la fosforilación de proteínas que está relacionada con diversos eventos metabólicos entre los que se encuentra la regulación del ciclo celular (Fabisz-Kijowska *et al.*, 1987; Hunter, 1987; Chiatante *et al.*, 1987; Trewavas & Blowers, 1990). En este mismo sentido, una cascada de eventos de fosforilación parecen llevarse a cabo previo a la fase S del ciclo

celular y pueden estar mediando la activación de las enzimas responsables de la replicación del DNA (Dunphy and Newport, 1988; Cyert & Thorner, 1989; Maller, 1990; Freeman & Donoghue, 1991)

Particularmente, nuestros resultados muestran que los ejes embrionarios embebidos en presencia de BA tienen un incremento en la fosforilación de proteínas conforme avanza la germinación, aspecto que pudiera ser debido a que se están activando elementos que intervienen en este fenómeno. De hecho existen diversas evidencias, en estos sistemas de estudio, que muestran que previo a la replicación del DNA se fosforilan varias enzimas que participan en ella, incluyendo la DNA polimerasa (Ackerman *et al.*, 1988; Cripps-Wolfman *et al.*, 1989; Radtke & Unteregger, 1988; Donaldson & Gerner, 1987; Krauss *et al.*, 1987; Kaiserman *et al.*, 1988).

Así, la fosforilación de proteínas pudiera ser un mecanismo inicial para que las células de los ejes embrionarios de maíz puedan salir del estado G₁ en el que se encuentra la mayoría (Deltour, 1985; Baiza *et al.*, 1989) y promover la activación de proteínas responsables de la replicación del DNA. Aún más, es conocido que durante la fase G₁ no se requiere de la síntesis de proteínas para avanzar hacia la G₁ tardía punto en el que sí es necesario la síntesis *de novo* (cf. Gauthier-Rouviere *et al.*, 1991), por lo que la fase G₁ es un estadio de control del ciclo celular que mayoritariamente se ve afectado por señales extracelulares (Pardee, 1989).

Ahora bien, una vez iniciada la replicación del DNA, ésta tiene que terminar y haber duplicado fielmente el genoma para que pueda llevarse a cabo la división celular. Nuestros resultados muestran que las diversas fases de la división celular se encuentran en los ejes embrionarios imbebidos en BA a tiempos más tempranos que los no tratados (Fig. 3 y Tabla I), por lo que podemos sugerir que ha habido una completa replicación del DNA que permite a las células

dividirse.

Los datos anteriores permitieron estudiar si la BA estaba involucrada en la activación de cinasas específicas para la división celular. Los datos del curso de reacción del ensayo para cinasa independiente de Ca^{2+} muestran que a las 24 horas de imbibición con BA se alcanza una actividad alta (Tabla V).

Particularmente la cinasa que se ha reportado como involucrada en la regulación de la división celular de células animales es la cinasa independiente de Ca^{2+} p34^{cdc2} (Muray & Kirschner, 1989; Dore, 1990; Nurse, 1990). Se logró detectar por inmunoblot una proteína de las mismas características de la p34^{cdc2} en los diferentes tiempos de imbibición (Fig. 9). El hecho interesante es que al hacer el inmunoblot, se reconoció un doblete en la muestra de 24 h de imbibición en presencia de BA, lo cual se ha sugerido que pudiera corresponder al estado activo de la cinasa p34^{cdc2} (Solomon *et al.*, 1990; Nishitani *et al.*, 1991). Si bien lo anterior no ha sido evaluado en vegetales, los datos obtenidos por diversos investigadores utilizando sistemas vegetales muestran una serie de bandas sobre la de 34 kD en las fracciones en que se encuentra la mayor actividad de la cinasa tipo p34^{cdc2}, lo cual pudiera indicar modificaciones del estado activo de esta cinasa (Feiler & Jacobs, 1990; John *et al.*, 1990).

Los anteriores resultados sugieren que la BA promueve la división celular concomitantemente a la activación de la enzima tipo p34^{cdc2}, sin embargo no conocemos si esta corresponde a síntesis *de novo* de la enzima o a su activación por otras proteínas, como es el caso para células animales.

CONCLUSIONES

Podemos señalar que la citocinina sintética Benzil-adenina está estimulando los siguientes eventos:

La incorporación de timidina [^3H] en el núcleo de células de ejes embrionarios de maíz, lo cual involucra síntesis de DNA nuclear.

La actividad de la enzima ADP-ribosil Polimerasa a tiempos en donde se lleva a cabo la reparación y/o replicación del DNA.

La fosforilación progresiva de proteínas conforme transcurre el tiempo de imbibición.

La estimulación de un tipo de proteínas-cinasas que son independientes de Ca^{2+} .

En el grupo de cinasas independientes de Ca^{2+} se encuentra la proteína p34^{cdc2} , la cual es importante en la regulación de la progresión del ciclo celular.

Interesantemente, la BA pareciera estar involucrada en el mecanismo que pudiera estar activando la cinasa p34^{cdc2} y de esta manera promover la división celular.

R E F E R E N C I A S

- Ackerman, P, Claiborne, V. C. G. & Osheriff, N. (1988). Phosphorylation of DNA topoisomerase II *in Vivo* and in Total Homogenates of *Drosophyla* Kc Cells. *J. Biol. Cheem.* 263:12653-12660
- Adamietz, P. & Rudolph. A. (1984) ADP-ribosilation of Nuclear Proteins *in Vivo*. Identification of Histone H2B as a Major acceptor for mono- and Poly(ADP-Ribose) in Dimethyl Sulfate-Treated Hepatoma AH 7974 Cells. *J. Biol. Chem.* 259:6841-6846
- Addicot, F. T. (1972). Biochemical Aspects of the Abscisic Acid. En: *Plant Growth Substances*. D. J. Carr (Ed.). Spring Berlag. pp. 272-280
- Addicott, F. T. & Lyos. (1969). Physiology of ABA related substances. *Ann. RE. Plant Physiol.* 20:139-164
- Albanell E., Plaixats J. & Andrés J. (1985). Interaction of ABA and 6-Benzyl-Amino Purine on the metabolism of *Lemma minor*. *Plant Cell Phys.* 26:1557-1564
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Keith R. & Watson, J. D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York Y Londons. pp. 435-455
- Alvarez-Gonzalez, R. & Althaus, F. R. (1989). Poly(ADP-Ribose) Catabolism in Mammalian Cells Exposed to DNA-Damaging Agents. *Mut. Res.* 218:67-74
- Baiza, A. M., Vázquez-Ramos, J. & Sánchez de Jimenez, E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues During Germination. *J. Plant Physiol.* 135:416-421
- Barlow, P. W. & Filet, F. E. (1984). The Effect of Abscisic Acid on the Cell Growth, Cell Division and DNA Synthesis in the Maize Root Meristeme. *Physiol. Plant.* 62:125-132
- Bergounioux, C., Perennes, C., Brown, S. C. & Gadal, P. (1988). Cytometric Analysis of Growth-Regulator Dependent Transcription and Cell-Cycle Progression in *Petunis* Protoplasts Cultures. *Planta* 175:500-505
- Bernal-Lugo I. (1984). Acción de fitorreguladores en Inducción de Enzimas Hidrolíticas en el Endospermo y su Control. En: *Cuadernos de Posgrado*, V. 11. *Bioquímica Vegetal.* pp. 87-102. Fac. de Química, UNAM.
- Berridge, M. V. & Ralph, R. H. (1969). Some Effects of Kinetin on Floated Chinase Cabbage Leaf Discs. *Biochim. Biophys. Acta* 182:266-269

Booo M. & Jacob. H. J. (1986). Cytokinin Effect on Branching and Bud Formation in *Funaria*. *Planta* 169:462-464

Bradford, M. M. (1976). A Refined and Sensitive Method for the Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248

Bray, G. A. (1972). A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solution in a Liquid Scintillation Counter. *Anal. Biochem.* 1:229-235

Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K. & Nurse, P. (1991). Involvement of p34^{cdc2} in establishing the dependency of S Phase on Mitosis. *Nature* 349:388-393

Boulikas, T. (1989). DNA Strand Breaks Alter Histone ADP-Ribosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3499-3503

Boulikas, T. (1990). Poly(ADP-Ribosylation) Histones in Chromatin Replication. *J. Biol. Chem.* 265:14638-14647

Cripps-Wolfman, J., Henshaw, E. C. & Bambara, R. A. (1989). Alterations in the Phosphorylation and Activity of DNA Polymerase α Correlate With the Change in Replicative DNA Synthesis as Quiescent Cells Re-enter the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.* 264:19478-19486

Cross, F., Roberts, J. & Weintraub, H. (1989). Simple and Complex Cycles. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:341-395

Cyert, M. S. & Thorner, J. (1989). Putting It On and Taking it Off: Phosphoprotein Phosphatases Involvement in Cell Cycle Regulation. *Cell* 57:691-693

Chean, K. S. E. & Osborne, D. J. (1970). DNA Lesions Occur with Loss of Viability in Embryo of Ageing Rye Seed. *Nature* 272:593-599

Chen D., Sarid S. & Katchalski E. (1968). Dependence of Protein Synthesis on RNA Synthesis During Early Hours of Germination of Wheat Embryos. *Nature* 277:66-67

Cheung, C. P., Wu J. & Suhaldonik, R. J. (1979). Dependence of Protein Synthesis on RNA Synthesis During the Early Hours of Germination of Wheat Emoryos. *Nature* 263:679-682

Chiatante, D., Levi, M., Sgorbati, S. & Sparvoli, E. (1987). Protein Kinase Activity in Meristematic root Tips of *Pisum sativum* During Germination. *Plat Science* 53:271-279

Ching, T. M. (1972). Metabolism of Germinating Seed. In: Seed Biology V. I. T. Kozlowski (ed.). Acad. Press, New York, N. Y. pp. 116-117

Dai, Y., Yu, Y. & Chen, X. (1987). The Cell-Cycle Dependent and the DNA-Damaging Agent-Induced Changes of Cellular NAD Content and Their Significance. *Mut. Res.* 191:29-35

Das, N. K., Patau, K. & Skoog, F. (1956). *Physiol. Plant.* 9:640-651; citado por Zwar

Deltour R. (1985). Nuclear Activation During Early Germination of the Higher Plant Embryo. *J. Cell Sci.* 75:43-83

Deltour R., Gautier A. & Fakan J. (1979). Ultrastructural Cytochemistry of the Nucleus in *Zea mays* Embryos During Germination. *J. Cell Sci.* 40:43-62

Dommes J. & Van de Walle C. (1983). Newly Synthesized mRNA is Translated During Initial Imbibition Phase of Germination Maize Embryo. *Plant Physiol.* 73:484-487

Donalson, R. W. & Gerner, E. W. (1987). Phosphorylation of a High Molecular Weight DNA Polymerase α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:759-763

Doré, M. (1990). Control of M-Phase by Maturation Promoting Factor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:269-273

Doré, M., Labbé, J-C. & Picard A. (1989). M phase-promoting factor: Its identification as the M Phase-Specific H1 Histone Kinase and Its Activation by Dephosphorylation. *J. Cell Sci. Suppl.* 12:39-51

Draetta, G. (1990). Cell Cycle Control in Eukaryotes: Molecular Mechanisms of CDC2 Activation. *Trends in Biochem. Sci.* 15:378-383

Dunhy, W. G. & Newport, J. W. (1988). Unraveling of Mitotic Control Mechanisms. *Cell* 55:925/928

Durán N., Bach M., Puigdomènech P. & Palau J. (1984). *Mol. Immun.* 21:731

Dure S. & Waters L. (1985). Long-Lived Messenger RNA: Evidence from Cotton Seed Germination. *Science* 147:410-412

Durkacz, B. W., Omidiji, O., Gray, D. A. & Shall, S. (1980). (ADF-Ribose) Participates in DNA Excision Repair. *Nature* 283: 593-596

Engrild, K. C. (1989). The Death Hormone Hypothesis. *Physiol. Plant.* 77:282-288

Fabiz-Kijowska, A. A., Lumley-Sapanski, K., Halleck, M. S. & Schlegel, R. A. (1987). Cellular Compartmentalization of Protein Kinase Activity During the Cell Cycle. *Biochem. Cell. Biol.* 65:1070-1079

Feiler, H. S. & Jacobs, T. W. (1990). Cell Division in Higher Plants: A *cdc2* Gene, Its 34-kDa Product, and Histone H1 Kinase Activity in Pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5397-5401

Ferré, S. S. & Torrey, J. G. (1976). Hormonal Control of Deoxyribonucleic Acid and Protein Synthesis in Pea Root Cortical Explants. *Plant Physiol.* 59:4-9

Ferro, A. M. & Olivera, B. M. (1984). Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from Calf Thymus. *J. Biol. Chem.* 259:547-554

Freeman, R. S. & Donoghue, D. J. (1991). Protein Kinases and Protooncogenes: Biochemical Regulators of the Eukaryotic Cell Cycle. *Biochem.* 30:2293-2302

Galli, M. G. (1984). Synthesis of DNA in Excised Watermelon Cotyledons Grown in Water and BA. *Planta* 160:193-199

Gauthier-Rouvière, C., Cavadore, J. C., Blanchard, J. M., Lamb, N. J. C. & Fernández, A. (1991). p67^{SRF} is a Constitutive Nuclear Protein Implicated in the Modulation of Genes Required Throughout the G₁ Period. *Cell Reg.* 2:575-588

González-Fernández, A., Selman, A. M., Giménez-Martín, G. & De la Torre, C. (1989). Protein Synthesis in Late Mitosis and in G₁ Required for Cell Cycle Progression in Synchronous Onion Root Meristem Cells. *Europ. J. Cell Biol.* 49:87-91

Gradwohl, G., Ménissier, J. de M., Molinete, M., Simonin, F., Koken, M., Hoziymakers, J. H. J. & De Murcia, G. (The Second Zinc-Finger Domain of Poly(ADP-ribose) Polymerase Determines Specificity for Single-Stranded Breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2990-2994

Greer, W. L. & Kaplan, G. (1986). Early Nuclear Events in Lymphocyte Proliferation. The Role of DNA Strand Break Repair and ADP Ribosylation. *Exp. Cell Res.* 166:399-415

Grey, J. E. & Bryant, J. A. (1984). Changes in the Activity of Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase During Germination of Pea. *Phytochem.* 23:477-478

Grierson D., Chambers, S. E. & Penniket, L. P. (1977). Nucleic Acid and Protein synthesis in Discs Cut from Mature Leaves of *Nicotiana glauca* L. and Cultured on Nutrient Agar With and Without Kinetin. *Planta* 134:29-34

Gutierrez C. (1987). Excision repair of Uracil in Higher Plant Cells: Uracil-DNA Glycosylase and Sister-Chromatid Exchanges. *Mut. Res.* 181:11-126

Horgan H. (1984). Cytokinins. In: *Advanced Plant Physiology*. Wilkins Malcolm B. (Ed.). The Pitman Press, Bath.

Houssa, C., Jacquard, A. & Bernier, G. (1990). Activation of Replicon Origins as a Possible Target for Cytokinins in Shoot Meristems of *Sinapis*. *Planta* 181:324-326

Hunter, T. & Cooper, J. A. (1985). Protein-Tyrosine Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 54:897-930

Jendrisak J. (1980). The Use of α -Amanitin to Inhibit *in vivo* RNS Synthesis and Germination in Wheat Embryos. *J. Biol. Chem.* 255:8529-8533

John, P. C. L., Sek, F. J., Carmichael, J. P. & McCurdy, D. W. (1990). p34^{cdc2} Homologue Level, Cell Division, Phytohormone Responsiveness and Cell Differentiation in Wheat Leaves. *J. Cell Sci.* 627-630

Kaiserman, H. B., Ingebritsen, T. S. & Eerbow, R. M. (1988). Regulation of *Xenopus laevis* DNA Topoisomerase I Activity by Phosphorylation *In Vitro*. *Biochem.* 27:3216-3222

Khan, A. A. (1967). Antagonism Between Cytokinins and Germination Inhibitors. *Nature* 216:166-167

Khan, A. A. (1971). Cytokinins: Permissive Role in Seed Germination. *Science* 171:853-859

Khan, A. A. & Heit, C. E. (1969). Selective Effect of Hormones on Nucleic Acid Metabolism During Germination of Pear Embryos. *Biochem J.* 113:707-712

Kohler K-H. & Conrad K. (1960). Ein Quantitativer Phytokini-Test. *Biol. Rdsch.* 4:36-7. Citado por Horgan.

Kondrashov, A. S. & Crow, J. F. (1991). Haploidy or Diploidy: Which is Better? *Nature* 351:314-315

Krauss, S- W., Mochly-Rose, D., Koshland Jr., D. E. & Linn, S. (1987). Exposure of HeLa DNA Polymerase α to Protein Kinase C Affects Its Catalytic Properties. *J. Biol. Chem.* 266:3432-3435

Krupitza, G. & Cerutti, P. (1989). ADP-Transferase I in Intact Mouse Epidermal Cells JB6. *Biochem.* 28:2034-2040

Labee, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P. & Doree, M. (1989). Purification of MPF from Starfish: Identification as the H1 Histone Kinase p34^{cdc2} and a Possible Mechanism for Its Periodic Activation

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T. *Nature* 227:680-685

Lerou S., Lerou W., Wollgienn R. & Partner B. (1985). Hormone (Cytokinin) and Light Effects in Rubisco Gene Expression. In: Molecular Form and function of the Plant Genome. Louis van Vloten-Doting, Gert S. P. Groot and Timothy C. (Eds.). Hall Plenum Press. New York and London. pp. 267-275

Lejeune, F., Kinet, J. M. & Bernier, G. (1988). Cytokinin Fluxes During Floran Induction in the Long Day Plant *Sinapis alba* L. Plant Physiol. 86:1096-1098

Lohka, M. J. (1989). Mitotic Control by Metaphase-Promoting Factor and CDC Proteins. J. Cell Sci. 92:131-135

Longo, G. P. O., Pedrett, M., Rossi G. & Longo, C. P. (1979). Effect of BA on the Development of Plastids and Microbodies in excised Watermelon Cotyledons. Planta 145:209-217

Maller, J. L. (1990). *Xenopus* Oocytes and the Biochemistry of Cell Division. Biochem. 29:3157-3166

Malik, K. A. & Sakena, P. K. (1991). Regeneration in *Phaseolus v. L.* Promotive Role of N⁶-Benzylaminopurine in cultures from Juvenile Leaves. Planta 184:148-150

Marcus A. & Feeley J. (1964). Activation of Protein Synthesis in the Imbibition Phase of Seed Germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51:1075-1079

Marcus A., Weeks, D. P., Leis, D. P. R. & Keller, E. B. (1970). Protein Chain Initiation by Methionyl-tRNA in Wheat Embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:1681-1687

Meléndez, L. S. G. (1990). Identificación de las DNA Polimerasas Nucleares Presentes en Ejes Embrionarios de Maíz Durante las Primeras Horas de la Germinación. Tesis de Maestría, Fac. de Química, UNAM. pp. 3

Ménissier-de Murcia, J., Molinete, M., Gradwohl, G., Simonin, F. & de Murcia G. (1989). J. Mol. Biol. 210:229-233

Mikulovitch, A. G. & Kulaeva, O. N. (1977). Synthesis of DNA in Isolated Pumpkin Cotyledons. Soviet Plant Physiol. 24:251-257; citado por Galli

Miller, C. O., Skoog, O., Okomura, F. S., Saltz, M. H. von & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. J. Am. Chem. Soc. 78:1345-1350

Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J. V., Wu, M & Hunt, T. (1989). The Role of Cyclins Synthesis, Modification and Destruction in the Control of Cell Division. J. Cell Sci. Suppl. 12:77-97

- Mitchell, D. L. & Hartman, P. S. (1990). The Regulation of DNA Repair During Development. *BioEssays* 12:74-79
- Mocquot B., Prat Ch., Mouches C. & Pradet A. (1981). Effect of Anoxia on Energy Charge and Protein Synthesis in Rice Embryos. *Plant Physiol.* 68:636-640
- Moreno, S. Hayles, J. & Nurse. P. (1989). Regulation of p34^{cdc2} protein Kinase During Mitosis. *Cell* 58:361-372
- Mory, Y. Y. Chen, D. & Sarid, S. (1972). Onset of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Germinating Wheat Embryos. *Plant Physiol.* 49:20-23
- Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (1989). Dominoes and Clocks: the Union of Two Views of the Cell Cycle. *Science* 246: 614-621
- Naito K., Tsuji H. & Hatekeyama I. (1978). Effect of BA on DNA, RNA, Protein and Chlorophyll Contents in Intact Bean Leaves: Differential Responses to BA According to Leaf Age. *Phys. Plant.* 43:367-371
- Nishitani, H., Ohtsubo, M., Yamashita, K., Lida, H., Pines, J., Yasudo, H., Shibata, Y., Hunter, T. & Nishimoto, T. (1991). Loss of RCC1, a Nuclear DNA-Binding Protein, Uncouples the Completion of DNA Replication from the Activation of CDC2 Protein Kinase and Mitosis. *EMBO J.* 10:1555-1564
- Nishinari N. & Syono K. (1986). Induction of Cell Division Synchrony and Variation of Cytokinin Contents Through the Cell Cycle in Tobacco Cultured Cell. *Plant Cell Physiol.* 27:147-153
- Nurse, P. (1990). Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase. *Nature* 344:503-508
- Osborne, D. J. (1982). DNA Integrity in Plant Embryos and the Importance of DNA Repair. In: Embryonic Development. Part B. Cellular Aspects. pp. 577-592. Callan R. Liss. Inc. 150 Fifth Ave. New York, N. Y. 1001.
- Osborne, D. J. (1983). Biochemical Control Synthesis Operating in the Early Hours of Germination. *Can. J. Bot.* 61:3568-3577
- Osborne, D. J., Dell'Aquila A & Elser, R. H. (1984). DNA Repair in Plant Cells. an Essential Event of Early Embryo Germination in Seeds. *Folia Biologica, Proc. FEBS Symposium on DNA.* Spec. Publ. pp. 155-164.
- Parker, C. W., Lethman, D. S. Gollnow, B. I., Summons, R. E., Duke, C. C. & Macleod, J. K. (1978). Regulators of Cell Division in Plant Tissues. *Planta* 142:239-251

- Parthier B. (1979). Phytohormones and Chloroplast Development. *Bioch. Physiol. Pflanze* 174:174-214
- Pérez, L., Aguilar, R. & Sánchez-de-Jiménez, E. (1987). Effect of An Exogenous Auxin on Maize Tissues. Alteration of Protein Synthesis and Phosphorylation. *Physiol. Plant.* 69:517-522
- Ferrot, V. Richerd, S. & Valero, M. (1991). Transition from Haplody to Diploidy. *Nature* 351:315-317
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. & Nigg, A. (1990). Identification of Major Nucleolar Proteins as Candidate Mitotic Substrates of CDC2 Kinase. *Cell* 60:791-801
- Phillips R. & Torre, J. G. (1973). DNA Synthesis, Cell Division, and Specific Cytodifferentiation in Cultured Pea Root Cortical Explants. *Dev. Biol.* 31:3336-3347
- Poovaiah. B. W., Reddy, A. S. N. & Mc Fadden, J. J. (1987). Calcium Messenger System. Role of Protein Phosphorylation and Inositol Bisenosolipids. *Physiol. Plantarum* 69:569-56673
- Radtke, J. & Unteregger, G. (1988). Phosphorylation Affects the DNA Affinity of the Nuclear Protein 24/7 from Human tumor Cells. *FEB* 236:367-371
- Ramos Perez Silvia, T. (1990). Efecto de la Benciladenina sobre la Actividad de la DNA Polimerasa Nuclear en Ejes Embrionarios de Maíz Durante las Primeras Horas de la Germinación. Tesis de Licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Risueño, M. C. & Moreno-Díaz, E. S. (1979). Ultrastructural and Cytochemical Study of the Quiescent Root Meristematic Cell Nucleus. *J. Submicrosc. Cytol.* 11:85-98
- Sánchez de Jiménez, E. & Aguilar, R. (1984). Protein Synthesis Patterns. Relevance of Old and New Messenger RNA in germinating Maize Embryos. *Plant Physiol.* 75:231-234
- Sánchez-Martínez D., Puigdoménech P. & Montserrat P. (1986). Regulation of gene expression in Developing Zea Mays Embryos. Protein Synthesis During Embryogenesis and Early Germination of Maize. *Plant Physiol.* 82:543-549
- Sargent, J. A. & Osborne, D. J. (1980). A Comparative Study of the Fine Structure of Coleorhiza and Root Cells During the Early Hours of Germination of Rye Embryos. *Protoplasma* 104:91-103
- Scrivastana, B. I. S. (1968). Increase in Chromatin Associated Nuclease Activity of Excised Barley Leaves During Senescence and Its Suppression by Kinetin. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 32:533-538
- Simon, E. W. (1984). Early Events in Germination. *En: Seed*

- Physiology, V. II. Germination and Reserve Mobilization. David R, Murray (Ed.). Acad. Press. Australia. pp. 77-115
- Simpson, S. S. & Torrey, J. G. (1977). Hormonal Control of DNA and Protein Synthesis in Pea Root Cortical Explants. *Plant Physiol.* 54:4-9
- Skoog F. & Miller, C. O. (1957). Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant tissues Cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Bio. Med.* 11:188-231. Cited por Wilkins, 1984
- Smigocki, A. C. & Owens, L. D. (1988). Cytokinin Gene Fused With a Strong Promoter Enhances Shoot Organogenesis and Zeatin Levels in Transformed Plant Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5131-5135
- Smigocki, A. C. & Owens, L. D. (1989). Cytokinin-to-Auxin Ratios and morphology of Shoots and Tissues Transformed by a Chimeric Isooctenyl transferase Gene. *Plant Physiol.* 91:808-811
- Solomon, M. J. Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, M. W. (1990). Cyclin Activation of p34^{cdc2}. *Cell* 63: 1013-1024
- Steward, G. R. & Smith H. (1972). Effect of ABA on Nucleic Acid synthesis and the Induction of Nitrate Reductase in *Lemna polyrrhiza*. *J. Exp. Bot.* 23:875-885
- Sussex I. Clutter M. & Walbot V. (1975). BA Reversal of Absciscic Inhibition and RNA Synthesis in Germinating Bean Axes. *Plant Phys.* 56:575-578
- Theologis A. (1986). Rapid Gene Regulation by Auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:407-438
- Towain H., Stachlein T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Acrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354
- Trewavas, A. J. & Blowers. D. P. (1990). Protein Kinase in the Plant Plasma Membrane. En: *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, V. 9.* Randall, D. D. & Blerins, D. G. (Eds.). The Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program, Univ. Missouri. pp. 153-163
- Tsuji H., Naito K., Hatekeyama I. & Ueda K. (1979). BA-Induced Increase in DNA Content Per Cell, Chloroplast Size, and Chloroplast Number Per Cell in Intact Bean Leaves. *J. Exp. Bot.* 30:1145-1151
- Vanderkrieken, W. M., Van Eldik, G., Nijtmaus, L., Croes, A. F. & Willems, G. J. (1991). Endogenous Cytokinins in Flower Bud Forming Explants of Tobacco. *J. Exp. Bot.* 42:77-80

Van de Walle C., Bernier E., Deltour R. & Bronchart R. (1976). Sequence of Reactivation of Ribonucleic Acid synthesis During Early Germination of the Maize Embryo. *Plant Physiol.* 157:632-639

Van Dijck, R., De proft, M. & De Greef, J. (1988). Role of Ethylene and Cytokinins in the Initiation of Lateral Shoot Growth in Bromeliads. *Plant Physiol.* 86:836-840

Van Overbeek J., Loeffler, J. E. & Mason, M. I. R. (1967). Dormin (Abscisin II), Inhibitor of Plant DNA Synthesis. *Science* 156:1497-1499

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

Vázquez-Ramos, J. M. & López S. (1986). Inhibición in vitro de la Síntesis de DNA Durante la Germinación Temprana de Embriones de Maíz por Novobiocina y Ara-ctp. *Rev. Soc. Química de México.* 30:119-123

Vázquez-Ramos, J. & Osborne, D. J. (1986). Analysis of the DNA Synthesis During Early Germination of Rye Chromatography. *Mut. Res.* 166:39-47

Vázquez-Ramos, J. M. & Reyes Jiménez, J. (1989). Efecto de las Citocininas Sobre la Síntesis de Ácidos Nucleicos. En: Cuadernos de Posgrado, 27. pp. 13-31. Departamento de Bioquímica Vegetal, División de Estudios de Posgrado, Fac. de Química. UNAM

Vázquez-Ramos, J. M. & Reyes Jiménez, J. (1990). Stimulation of DNA Synthesis and DNA Polymerase Activity by Benzyladenine During Early Germination of Maize Axes. *Can. J. Bot.* 45:649-653

Veleminsky J. & Gichner T. (1978). DNA Repair in Mutagen Higher Plants. *Mut. Res.* 55:71-84

Villers, T. A. (1968). An Autoradiographic Study of the Effect of the Plant Hormone ABA on Nucleic Acid and Protein Metabolism. *Planta* 82:342-354

Walker, J. C. & Zhang, r. (1990). Receptor Protein Kinases in Higher Plants. En: Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, V. 9. Randall, D. D. & Blerins, O. G. (Eds.). The Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program, Univ. Missouri. pp. 398-406

Walton, D. C., Soofi, g. S. & Sondheimer E. (1970). The Effect of Absciscic Acid on Growth and Nucleic Acid synthesis in Excised Embryonic Bean Axes. *Plant Physiol.* 45:37-40

Yadav, S. P. (1976). Rhythmic Increase in DNA Content and

Incorporation of $^3\text{[H]}$ Thymidine in the Developing Wheat Embryo During Seed Germination. *Planta* 129:87-89

Yokoyama M., Naito K. & Suzuki H. (1980). Effects of BA on Chlorophyll, DNA, RNA, and Protein Content on Attached Young Bean (*Phaseolus v. L.*) Leaves. *Ann. Bot.* 45:649-653

Yokoyama M., Naito K. & Suzuki H. (1981). BA-Enhanced Cell Proliferation and -Suppressed Greening in Attached Young Bean Leaves. *Plant Cell Physiol.* 22:623-627

Zarain, H. M., Bernal-Lugo I & Vázquez-Ramos, J. M. (1987). Effect of BA on the DNA Synthesis During Early germination of Maize Embryo Axes. *Mut. Res.* 181:103-110

Zwar, J. A. (1973). Effects of Cytokinins on the Nucleic Acids of Tobacco Pith. *J. Exp. Bot.* 24:701-710