

178
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO INMUNOLOGICO COMPARATIVO DE
PROTEINAS DE RESERVA PRODUCIDAS POR
EMBRIONES SOMATICOS Y CIGOTICOS DE
ALFALFA *Medicago sativa* L."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES ROJAS MORALES



México, D. F.

1991

FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

Abreviaturas.....	i
Indice de figuras y tablas.....	ii
I RESUMEN.....	iv
II ANTECEDENTES.....	1
2.1. Cultivo de tejidos vegetales.....	1
2.1.1. Organogénesis.....	2
2.1.2. Embriogénesis somática.....	3
A) Embriogénesis directa.....	5
B) Embriogénesis indirecta.....	5
2.2. Embriogénesis somática en alfalfa como modelo de estudio.....	6
2.3. Importancia de la alfalfa.....	7
2.3.1. Importancia de la alfalfa en México.....	9
2.3.2. Descripción botánica.....	9
2.3.3. Distribución.....	10
2.4. Embriogénesis cigótica.....	10
2.4.1. Estambre y polen.....	12
2.4.2. Ovulo y megagametofito.....	12
2.4.3. Polinización.....	14
2.4.4. Doble fertilización.....	16
2.4.5. Cigoto y embrión.....	16
2.5.6. Síntesis y acumulación de material de reserva.....	18
2.5. Paralelismo entre la embriogénesis somática y cigótica.....	18
2.6. Proteínas de reserva.....	22
2.6.1. Globulinas del tipo 11S.....	24
2.6.2. Globulinas del tipo 7S.....	24

2.7. Los cuerpos proteicos y su relación con las proteínas de reserva.....	26
2.8. Regulación del metabolismo de la proteínas de reserva en los cotiledones.....	29
2.9. Caracterización electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.....	31
2.10. El uso de los anticuerpos.....	32
2.10.1. Antígeno.....	33
2.10.1.1. Uso de adyuvantes.....	34
A) Adyuvante Completo de Freund...	34
B) Adyuvante Incompleto de Freund.	35
2.10.2. Anticuerpo.....	35
2.10.2.1. Diferentes tipos de anticuerpos...	39
A) Anticuerpos monoclonales.....	39
B) Anticuerpos policlonales.....	39
2.10.3. Reacciones antígeno-anticuerpo.....	40
2.10.4. Especificidad de los anticuerpos.....	41
2.10.5. Respuesta primaria y secundaria de los anticuerpos.....	42
2.11. Métodos inmunológicos.....	44
2.11.1. Inmunodifusión doble.....	44
2.11.2. Inmunolectroforesis.....	45
2.11.3. ELISA.....	45
2.11.4. Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa e inmunodetección por peroxidasa.....	47
III HIPOTESIS.....	49
IV OBJETIVOS.....	49
4.1. Objetivos generales.....	49
4.2. Objetivos particulares y metas.....	50

V MATERIALES Y METODOS

5.1. Material biológico.....	51
5.2. Embriogénesis somática.....	51
5.2.1. Preparación del medio y condiciones de cultivo.....	51
5.3. Análisis de las proteínas de reserva.....	52
5.3.1. Análisis de las proteínas de reserva de embriones somáticos, cigóticos y los di- ferentes tejidos que conforman la planta.....	53
A) Embriones cigóticos.....	53
B) Embriones somáticos.....	54
C) Tejidos que conforman la planta.....	55
5.3.2. Extracción de proteínas de reserva.....	55
5.3.3. Cuantificación de proteína por el método Bradford.....	57
5.3.4. Caracterización de los patrones de bandeo de las proteínas de reserva mediante geles de poliacrilamida-SDS.....	58
A) Preparación del gel de poliacrilamida-SDS..	58
B) Preparación y desnaturalización de las muestras.....	58
C) Tendido y destendido de geles.....	59
5.4. Obtención de anticuerpos policlonales contra las proteínas de reserva siguiendo diferentes esquemas de inmunización.....	59
5.4.1. Inmunización de conejos.....	60
5.4.2. Esquemas de inmunización.....	60
5.4.3. Sangrado de conejos y obtención de antisueros.....	63
5.5. Caracterización de los anticuerpos	64
5.5.1. Inmunodifusión doble.....	64
A) Preparación de placas.....	64

B) Lavado de placas.....	65
C) Tinción de las placas.....	65
5.5.2. Punto de equivalencia.....	66
5.5.3. Inmuno-electroforesis.....	66
5.5.4. ELISA.....	68
5.6. Pruebas para demostrar la especificidad de tejido y estado de desarrollo por inmunodifusión doble.....	70
5.7. Transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida-SDS a papel de nitrocelulosa e inmunodetección por peroxidasa.....	70
5.8. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	71
5.8.1. Tratamiento para embriones somáticos.....	71
5.8.2. Tratamiento para embriones cigóticos.....	72
VI RESULTADOS Y DISCUSION.....	74
VII CONCLUSIONES.....	150
VIII APENDICES.....	152
IX BIBLIOGRAFIA.....	156

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BTSA	2,2' -di-(3-ethylbenzylthia-zoline sulfonic acid)
Bs	Gamborg <i>et al</i>
BSA	Albumina de suero bovino
CPB	Amortiguador de fosfatos y citrato
EDTA	Etilen dimetil tetracetato de sodio.
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N,N', N',-tetra acetic acid.
ELISA	Análisis inmunosorbente ligado a enzimas
MS	Murashige y Skoog
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBS-T	Amortiguador de fosfatos salino-Tween 20
PEG	Poli-etilenglicol
PMSF	Fenil metil sulfonyl fluoruro
PNC	Papel de nitrocelulosa
PSA	Persulfato de amonio
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan Monoaurate.
TBS	Tris base salino
TTBS	Tris base salino-Tween 20
2,4.D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 2.1	La planta de alfalfa.....	11
Figura 2.2	El desarrollo del grano de polen.....	13
Figura 2.3	Desarrollo del óvulo.....	15
Figura 2.4	Eventos de la doble fertilización.....	17
Figura 2.5	Acumulación de proteína y desarrollo morfológico de los embriones en la maduración de la semilla de mostaza	19
Figura 2.6	Ontogenia de los embriones somáticos y cigóticos.....	20
Figura 2.7	Modelo esquemático de la estructura cuaternaria de legumin.....	25
Figura 2.8	Estructura de la inmunoglobulina IgG.....	37
Figura 2.9	Estructura de un anticuerpo.....	38
Figura 2.10	Respuesta de los anticuerpos en el suero contra un antígeno convencional.....	43
Figura 2.11	ELISA. Esquema del método de tinción utilizando anticuerpos marcados con peroxidasa.....	46
Figura 2.12	Ensamble para transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.....	48
Figura 5.1	Vía de inmunización de acuerdo a cada esquema seguido.....	62
Figura 5.2.	Sangrado de conejos por vacío.....	63
Figura 5.3	Cámara de electroforesis apropiada para la técnica de inmunoelectroforesis.....	67
Tabla II. 1	Características específicas de las proteínas de reserva de alfalfa.....	23

Tabla VI.1	Tiempos de homologías entre embriones cigóticos y somáticos.....	76
Tabla VI.2	Respuesta de los diferentes antisueros contra la proteína de reserva.....	80
Tabla VI.3	Cantidad de proteína de los diferentes tejidos que conforman la planta.....	92
Tabla VI.4	Constantes de las curvas de calibración de cada extracción.....	92

RESUMEN

La alfalfa es una planta agrónomicamente importante, es una leguminosa que, junto con otras constituye una fuente importante de alimentación para el ganado y el hombre por su alto contenido proteico, además son plantas que por su simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* fijan el nitrógeno en el suelo.

En esta especie se ha logrado obtener embriogénesis somática por medio de cultivo de tejidos vegetales, lo cual tiene una importante aplicación biotecnológica como es la posibilidad de producir semillas artificiales.

Así el sistema de alfalfa puede ser usado como modelo para otras leguminosas importantes.

Para poder usar la embriogénesis *in vitro* como un modelo de estudio es necesario que exista cierto paralelismo a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico entre el desarrollo del embrión somático y del cigótico. Por lo que este estudio está enfocado principalmente a conocer este grado de paralelismo entre los dos sistemas de embriogénesis.

Para la realización de este estudio se trabajó con embriones somáticos que fueron obtenidos de peciolo de las plantas de alfalfa de la línea A 70.34.

Los peciolo fueron colocados en un medio de inducción (en presencia de reguladores), a los 18 días fueron transferidos al medio de desarrollo (libre de reguladores) hasta el día 42, completando la fase de desarrollo, los embriones fueron rescatados a un medio basal MS al 50%.

Para obtener embriones cigóticos, se marcaron flores en antesis en el campo de acultivo y posteriormente se colectaron embriones inmaduros de 15, 30, 45 y 60 días post antesis.

Se extrajeron y purificaron las proteínas de reserva 7S y 11S de la semilla para usarlas como antígenos para la obtención de anticuerpos policlonales mediante tres diferentes esquemas de

inmunización, obteniéndose un total de 13 lotes de antisueros

Los sueros fueron caracterizados por inmunodifusión doble, inmunolectroforesis y ELISA con el objeto de conocer que tan específicos eran contra las proteínas de reserva y poder así utilizarlos posteriormente.

Se observó que independientemente del esquema seguido existió heterogeneidad en la respuesta de los anticuerpos hacia los diferentes antígenos.

Para hacer una comparación del grado de paralelismo que existe entre ambos sistemas se buscaron marcadores bioquímicos de la embriogénesis que fueran tejido y estado específicas y, se consideró a las proteínas de reserva como excelentes marcadores. Se propuso que si estas proteínas se encontraban en los embriones somáticos esto indicaría cierto grado de paralelismo.

Se hicieron extracciones de proteína de reserva de los diferentes tejidos que conforman la planta: hoja, peciolo, tallo, raíz y flor así como de embriones sexuales y se cuantificaron por el método de Bradford. Se encontró que es la semilla el órgano que mayor cantidad de proteína acumula.

Con los anticuerpos producidos y las proteínas extraídas de los diferentes tejidos se hicieron pruebas de especificidad de tejido mediante inmunodifusión doble, en donde se observó que los anticuerpos no son capaces de reconocer a ningún determinante antigénico de las proteínas extraídas de los diferentes tejidos y únicamente reconocen a las proteínas de semilla.

Se separaron las proteínas de los diferentes tejidos así como las de semilla mediante geles de poliacrilamida y se caracterizó su patrón de bandeo.

Conociendo estos patrones de bandeo, se corrieron geles para ser transferidos a papel de nitrocelulosa y hacer una inmunodetección con los anticuerpos.

Los resultados indicaron que el patrón de bandeo de las proteínas de semilla es muy diferente al patrón presentado por los diferentes tejidos. Además el reconocimiento de los anticuerpos fue mayor hacia las proteínas de semilla, siendo muy bajo hacia

las proteínas de los diferentes tejidos.

Los embriones somáticos fueron analizados por los mismos métodos de: inmunodifusión doble, patrones de bandeo e inmunodetección en papel de nitrocelulosa, encontrándose que el patrón de bandeo de los embriones somáticos es muy similar al de los embriones cigóticos y los anticuerpos obtenidos contra las proteínas de reserva de semilla fueron capaces de reconocer las proteínas producidas por los embriones somáticos tanto por inmunodifusión doble como por inmunodetección en papel de nitrocelulosa.

Para apoyar los resultados anteriores se hizo un estudio comparativo entre los embriones somáticos y cigóticos a nivel de microscopía óptica y electrónica.

Se seleccionaron embriones somáticos de 35 días de desarrollo y embriones cigóticos de 60 días post antesis. El estudio comparativo se hizo a nivel de eje embrionario y cotiledón.

La primera observación fue la relación cotiledones-eje embrionario, en los embriones somáticos los cotiledones se encuentran fusionados y son mucho más pequeños en relación al eje embrionario, en los embriones sexuales los cotiledones ocupan la mayor parte del embrión.

De manera general se observó que las células que conforman el embrión somático se encuentran muy vacuoladas, principalmente aquellas que conforman los cotiledones, existen abundantes organelos citoplásmicos como amiloplastos, núcleos con nucleolos grandes, polisomas y gran cantidad de mitocondrias.

En los embriones cigóticos prácticamente no había organelos citoplásmicos y la mayor parte del citoplasma está ocupado por cuerpos proteicos conteniendo proteína de reserva empaquetada.

I I A N T E C E D E N T E S

2.1. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Desde sus inicios, el hombre ha dependido básicamente de los vegetales como fuente original de energía. Al aumentar rápidamente la población, se ha hecho necesario implantar técnicas de explotación, en particular agronómicas.

El cultivo de tejidos vegetales es una rama de la biotecnología en la que México y otros países pueden obtener grandes beneficios a corto y largo plazo (Robert y Loyola, 1985).

El empleo de esta técnica tiene amplia aplicación en varios aspectos fundamentales como:

- Multiplicación vegetativa
- Cultivos de meristemas para la obtención de plantas libres de virus.
- Preservación del germoplasma.
- Fusión de protoplastos.
- Recuperación de plantas en peligro de extinción
- Mejoramiento genético.
 - Como la obtención de variedades tolerantes a la sequía o salinidad.
- Obtención de metabolitos secundarios los cuales van teniendo una mayor importancia en la industria.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en sembrar *in vitro* en forma aseptica ápices de raíz y de tallo, primordios de hojas y de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros e inmaduros, segmentos de tallo y hojas, así como ovarios, óvulos y anteras y polen, en medios nutritivos adecuados y bajo condiciones ambientales controladas (Street, 1977).

El fundamento inicial de esta técnica está basada en la totipotencialidad de las células vegetales. Si se acepta que la totipotencialidad implica que cada una de las células de un organismo multicelular tiene todas las instrucciones e información genética necesaria para desarrollar un organismo completo totalmente multicelular, bajo las condiciones nutritivas y ambientales necesarias para que se exprese su genoma y que en muchas especies vegetales las células de algunos órganos, mantienen su capacidad para dividirse cuando son separadas de la planta y cultivadas *in vitro*. (Street, H.E. 1977) (Thorpe, 1980; Evans, *et al* 1981; Flick, *et al* 1983 en Villegas G.T. 1985), entonces sería posible dirigir a dichas células a diferentes rutas morfogénicas mediante su desarrollo en medio y condiciones adecuadas (Komamine 1980 en Villegas G.T. 1985).

La regeneración de plantas a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales se puede llevar a cabo por dos vías:

- a) Organogénesis.
- b) Embriogénesis somática.

2.1.1. ORGANOGÉNESIS

La propagación de la planta a través de la organogénesis es la formación y desarrollo de una estructura unipolar (meristemo apical o meristemo radicular) y frecuentemente muestra una conexión con los elementos vasculares de la planta madre o el callo, para poder obtener la formación de la planta completa habría que hacer una serie de manipulaciones para lograr la formación del otro polo y obtener así la estructura bipolar.

Se puede definir el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según su apariencia externa, textura y composición celular. (Murtado M.D. 1987)

El proceso organogénico requiere la formación de brotes o raíces adventicias, ya sea directamente del inóculo. (hoja, peciolo, tallo, raíz, etc.) o con intervención de una fase de callo, los brotes deben enraizarse y posteriormente aclimatarse en invernadero. Este método requiere un mayor número de manipulaciones, una mayor cantidad de fuente de inóculo y se obtiene una baja cantidad de propágulos (Stylerr, 1985 en Peña, 1988).

2.1.2. EMBRIOGENESIS SOMATICA

La capacidad de las plantas para producir embriones no está restringido al desarrollo del huevo fertilizado, actualmente estos pueden ser inducidos por la técnica de cultivo de tejidos vegetales por la vía de embriogénesis somática (Doods, 1984).

La mejor definición para categorizar a una estructura vegetal como un embrión en comparación con otros desarrollos morfológicos es la bipolaridad, es decir, el hecho de que en los estados más tempranos de desarrollo presenta terminales opuestas como un meristemo apical y un meristemo radicular que más tarde nos darán origen a una planta completa. Además este sistema no está conectado con la planta madre o el explante durante la inducción y desarrollo (Street H.E., 1977).

Se ha postulado que los embriones en cultivo se forman a partir de una sola célula, generalmente sobre la superficie del callo, ya que según Dos Santos 1983, el callo friable da origen a un grupo de embrioides verdes en la superficie. Estos grupos se originan de un nódulo compacto común del tejido calloso, consistiendo de pequeñas células parenquimatosas con una capa externa de células meristemáticas competentes que dan origen a embriones.

El que sean originados de una célula es una pregunta que aún no tiene respuesta. Su identificación como embriones está basada fundamentalmente en observaciones morfológicas, es decir, la secuencia de eventos durante su formación y desarrollo. Que emulan aquellos descritos para embriones cigóticos los cuales

evolucionan del estado globular, corazón, torpedo y finalmente el estado cotiledonar.

La formación del embrión adventicio bipolar comienza como una organogénesis con la desdiferenciación del tejido aislado o células pero procede subsecuentemente en una ruta diferente de desarrollo que los órganos monopolares (Street, 1977).

Bajo condiciones experimentales apropiadas la formación de embriones in vitro es un proceso continuo donde ocurren varios estadios embrionarios. Este concepto se basa en el modelo casi idéntico de la división celular durante la embriogénesis desarrollada en condiciones naturales y la embriogénesis in vitro. (Reinert 1964 en Street, 1977).

En *Medicago sativa* ocurre una variación en el desarrollo de embriones de acuerdo con el modelo de desarrollo de embriones in vivo. Se considera que en embriones cigóticos el suspensor es filiforme mientras que en los embriones somáticos es reducido y multicelular (Dos Santos, 1983).

Maheshwari 1950, Mosand y Kapil 1966 citados por Bohdanomicz 1987 propusieron que el suspensor mantiene al embrión en una posición adecuada y lo empuja hacia el interior del saco embrionario donde puede estar en contacto con el endospermo rico en nutrientes. Sin embargo, investigaciones en citoquímica y ultraestructura del suspensor han puesto atención a la probable función del suspensor en la absorción, síntesis y/o translación de nutrientes del tejido materno al embrión.

El papel del suspensor en el transporte de metabolitos es apoyado por la presencia de numerosos plasmodesmos uniendo una célula con otra y con el embrión, mientras que al mismo tiempo los plasmodesmos están ausentes de las paredes externas del embrión.

La producción de embriones somáticos a partir de células, tejidos u órganos puede ocurrir directa o indirectamente (Dixon, 1985):

A) EMBRIOGENESIS DIRECTA

Un modo directo en la embriogénesis somática involucra la formación de un embrión asexual a partir de una sola célula o grupo de células en una parte del tejido del inóculo sin la intervención de una fase de callo. La embriogénesis directa ha sido reportada en algunos cultivos de anteras y protoplastos. Sin embargo, es rara en comparación con el modo indirecto de la embriogénesis (Dixon, 1985).

B) EMBRIOGENESIS INDIRECTA

El modo indirecto de la embriogénesis consiste en el establecimiento de un inóculo en el medio de cultivo, subsecuente proliferación de callo e iniciación de pro-embriones (usualmente en medio conteniendo una alta concentración de auxina) y transferencia del callo a un medio nutriente libre de reguladores de crecimiento para propiciar el desarrollo de los embriones. Cuando las condiciones son apropiadas estos embriones germinan para producir plantas. Generalmente sólo un pequeño porcentaje de las células de los inóculos contribuye a la formación del callo. Estas células son generalmente localizadas en las capas superficiales que están en contacto físico con el medio nutriente. El callo es heterogéneo en naturaleza y puede estar compuesto por numerosos tipos de células incluyendo pro-embriones iniciales.

La formación de embriones somáticos se puede lograr empleando un apropiado medio de nutrientes, seleccionando un medio de cultivo y el explante (Dixon, 1985).

Tres factores principales pueden controlar la regeneración *in vitro*, estos son: tipos y concentración de la auxina utilizada, la concentración de cinetina exógena y el nivel de nitrógeno total así como la relación de nitrógeno reducido en el medio de regeneración.

La fuente de nitrógeno juega un papel muy importante en el desarrollo de los embriones, la cual tiene que ser una mezcla de

nitrato y amonio.

Otro factor que es muy importante en la inducción de embriones es la auxina empleada, así como la concentración óptima y el tiempo durante el cual se debe estar en contacto con ella, el cual parece tener influencia en la calidad de los embriones.

Con respecto a las condiciones de cultivo, un aspecto muy importante es el de la presión osmótica del medio, el cual puede ser seguido mediante variación en el tipo y concentración de carbohidratos que sirven tanto de fuente de carbono como de agentes osmóticos. Las condiciones de iluminación y la longitud del fotoperíodo también tienen efecto en la inducción y desarrollo del embrión; así como los efectos de pH. (Villegas, 1988).

2.2. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN ALFALFA COMO MODELO DE ESTUDIO

Aunque las dos vías de propagación, tanto la organogénesis como la embriogénesis somática son ampliamente utilizadas de acuerdo a los fines que se persigan, la embriogénesis somática es un método de propagación *in vitro* que muchos investigadores consideran de mayor potencialidad dado que es una vía más directa y por lo tanto más rápida lo que implica un importante ahorro de tiempo y recursos al obtenerse una estructura bipolar con un menor número de manipulaciones que en el caso de la organogénesis.

Sin embargo, aunque la embriogénesis somática representa ciertas ventajas con respecto a otras formas de propagación, esta se encuentra restringida a un pequeño número de especies, entonces nos preguntamos ¿Por qué la embriogénesis somática no es extensiva a todas las especies?. Dar respuesta a esta pregunta fue la razón por la que se consideró necesario tratar de desarrollar un modelo de embriogénesis *in vitro* que sea lo más similar a la embriogénesis cigótica, el cual nos permita llevar a cabo estudios a diferentes niveles pero con la condición de que todo lo que suceda en este modelo sea un reflejo de lo que ocurre en la naturaleza y poder encontrar respuesta a esta y otras interrogantes.

La naturaleza artificial del cultivo de tejidos y su dependencia exógena de reguladores de crecimiento y nutrientes hacen que se pueda tomar ventaja para adquirir conocimiento de los factores que regulan el desarrollo de los embriones a partir de una célula y los mecanismos de regeneración de una planta.

Para poder usar la embriogénesis *in vitro* como un modelo de estudio es necesario que exista un cierto paralelismo a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico entre el desarrollo del embrión somático y del embrión cigótico; es decir, que las cualidades de ambos a nivel molecular, sean equivalentes.

Este punto es importante si se considera que los resultados obtenidos con los estudios en cultivo deben permitir adquirir un conocimiento más profundo de lo que ocurre en la naturaleza, donde es en muchos casos muy difícil de tratar de variar algunos factores y mantener constantes otros cuando se está trabajando con la planta *in toto*.

La alfalfa es una especie en la que se ha logrado obtener embriogénesis somática por medio del cultivo de tejidos vegetales lo cual, tiene una importante aplicación biotecnológica como es la producción de semillas artificiales, y aunque esta no trata de competir con la producción convencional, si constituye una alternativa para aumentar la producción agrícola, teniendo una producción continua sin depender de su ciclo ni de las condiciones ambientales.

El sistema de alfalfa puede ser usado como modelo para la investigación en otras leguminosas importantes como es el caso de frijol, chicharo, soya, lenteja, etc

2.3. IMPORTANCIA DE LA ALFALFA

La alfalfa, llamada algunas veces la "reina de las plantas forrajeras" es una de las plantas más importantes de este tipo.

La alfalfa es una leguminosa agrónicamente importante, de pastura superior para muchas clases de ganado debido a su alto rendimiento, calidad de forraje y amplia adaptación al clima y al

suelo. Es una fuente segura y económica de proteínas para el animal en pastoreo, porque es independiente del nitrógeno del suelo ya que presenta la ventaja de tener asociación simbiótica con bacterias del genero *Rhizobium*, que tiene la facultad de fijar el nitrógeno atmosférico y producir nitrificación de los suelos. Su proteína es de buena calidad y especialmente importante para el pastoreo de los no rumiantes, como los porcinos, las aves de corral y los caballos. Además, es una fuente excelente de calcio, magnesio, fósforo y vitaminas A y D, y generalmente es de mayor consumo que las gramíneas de igual digestibilidad (Hanson, 1972a).

La alfalfa ofrece mayores posibilidades al productor de ganado que muchas de las leguminosas de pastoreo, ya que al presentar una forma de crecimiento erguido y una rápida recuperación se presta para recogerla como heno y alimento verde, así como también para el pastoreo. Esta flexibilidad es una característica valiosa en las zonas ganaderas donde en parte del año se utiliza alimento cosechado. Su resistencia a la sequía también permite un crecimiento estacional más uniforme que el de la mayoría de las leguminosas y gramíneas.

Las semillas de las leguminosas después de los cereales son la segunda fuente de alimento y forraje de los animales. Nutricionalmente ellos son dos o tres veces más ricos en proteínas que los granos de los cereales. Sin embargo, se le ha dado un mayor énfasis a los cereales por lo que su producción está por debajo de estos. Como el costo de las fuentes de proteínas animales tales como la carne, leche, huevo y pescado se va incrementando rápidamente, las leguminosas ofrecen un camino para la solución del problema para un amplio rango de proteínas, en los países en desarrollo (Auhors, et al 1985).

Se produce anualmente más de un millón de toneladas de harina de alfalfa. Esta puede obtenerse de hojas que contienen 21.2% de proteína; la harina de tallos 11.5% y la harina completa 18.9%. La mayor parte de la harina de alfalfa, se usa en mezclas comerciales de alimentos pecuarios (Hughes, et al 1978). (Guía para la

asistencia técnica agrícola S.A.R.H., I.N.I.A. 1985).

Recientemente se ha incrementado mucho la preparación de la harina de alfalfa en pastillas. En muchos tipos de animales, se logra también un mayor aumento de peso vivo por día, cuando se proporciona harina de alfalfa en pastillas (Hughes, H.D. et al 1978).

2.3.1. IMPORTANCIA DE LA ALFALFA EN MEXICO

La alfalfa constituye en la actualidad el forraje sobre el que se basa la producción de leche en el altiplano central y en el norte del país.

En Guanajuato se cultivan alrededor de 45 mil hectáreas de esta leguminosa, cuya producción abastece la demanda del estado, sus excedentes se envían principalmente a los estados de México, Querétaro y Jalisco.

La alfalfa se utiliza principalmente para la alimentación del ganado bovino lechero y para la elaboración de alimentos concentrados para aves y cerdos debido a su alta producción y a su excelente calidad forrajera, su demanda se ha incrementado en los últimos años.

Las variedades que han producido los mejores rendimientos son aquellas que durante la época de frío no son afectadas en su desarrollo, tales como la criolla o las que han sido formadas mediante la selección a partir de su desarrollo.

Para el centro de Guanajuato las variedades que han demostrado mayor capacidad de rendimiento son: Puebla 76, Inia 76, Bajío 76, San Miguelito, NK 819, Moapa, Matador y Astro. Para el sur no se encuentra información suficiente, pero se ha observado buen desarrollo de las variedades Moapa, Inia y Tanhuato (Guía para la asistencia técnica agrícola S.A.R.H., I.N.I.A. 1985).

2.3.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta perenne con una raíz axonomorfa, tallos herbáceos y erectos que alcanzan una altura de 80 a 90 cm. y nacen de una

corona leñosa. Las hojas son alternas, compuestas trifolioladas, con folíolos ovados, denticulados hacia el ápice.

Las flores son pequeñas, agrupadas en racimos axilares cortos de 1.2 a 2.5 cm., normalmente de fecundación cruzada, de color azul a violeta; el cáliz es dentado, la corola simpetalá con 9 estambres. (Figura 2.1) (Guía para la asistencia técnica agrícola S.A.R.H., I.N.I.A., 1985).

El fruto es una vaina pubescente espiral o curvada, indehisciente y posee de dos a cuatro, raramente cinco, espiras de 5 a 9 mm de diámetro. A medida que la vaina se enrosca durante la maduración, las semillas adyacentes pueden verse forzadas a juntarse. Esta acción interna da como resultado la característica de angulocidad observada. Las semillas maduras tienen aproximadamente 2.5 mm de largo, 1.5 de ancho y 1.1 de espesor, y son de color amarillo brillante o de verde oliva a marrón, raramente blancas o negras. La semilla está compuesta por dos cotiledones, una radícula, un epicótilo en el cual están las primeras hojas, el endospermo, que es de un cuarto a un medio del volumen del embrión, una cubierta seminal coloreada, con un hilo ubicado centralmente. (Hanson, 1972 b).

2.3.3. DISTRIBUCION

Es una planta proveniente del Cercano Oriente y Centro de Asia. *Medicago sativa* L. tiene dos centros de origen. El primero fue en el "Cercano Oriente Central", zona integrada por Asia Menor, Transcaucasia, Iran y la región montañosa de Turkmenistan. La especie *Medicago falcata* L. se extiende hacia el norte, en Siberia, y la región de Eurasia.

La alfalfa se adapta notablemente bien a un amplio margen de condiciones de clima y de suelo.

2.4. ENBRIOGENESIS CIGOTICA

Para poder comparar que tan paralelo es el sistema de embriogénesis somática en alfalfa con el de embriogénesis cigótica



FIG. 2.1

LA PLANTA DE ALFALFA; (A) UNA PLANTA MOSTRANDO UN SISTEMA RADICULAR DESARROLLADO Y VARIAS RAICILLAS (O RAICES SECUNDARIAS CRECIENDO DE LA CORONA). (B) RAMA EN FLORACION DESPUES DEL REBROTE. (C) TRES ENFOQUES DE UNA FLOR, AUMENTADA DE TAMAÑO. (D) RAMA CON FRUTOS CON FORMA DE VAINAS, CUATRO SEMILLAS Y UNA SEMILLA AUMENTADA DE TAMAÑO.
 (HANSON C.H. 1972)

es necesario primero, mencionar como se lleva a cabo la segunda.

2.4.1. ESTAMBRE Y POLEN

Las anteras de los estambres son los sitios donde se forma el polen. Muchas anteras tienen cuatro lóbulos. El centro de cada lóbulo contiene una columna de células las cuales son el microesporocito o célula madre de la microspora con $2n$ cromosomas. Estas células madre están rodeadas de un tejido llamado tapetum, el cual proporciona los nutrimentos para las células madre y el desarrollo de las microsporas.

Cada célula madre de la microspora sufre meiosis y produce cuatro microsporas haploides. Seguido de la meiosis las cuatro microsporas de cada tetrada generalmente se separan. Una elaborada pared se forma entonces alrededor de las microsporas, y el núcleo de cada microspora se divide en dos. Uno es el núcleo (o tubo) vegetativo, el cual funciona como el núcleo del grano de polen y tubo polínico. El segundo núcleo llega a estar rodeado por una pequeña cantidad de citoplasma, una membrana plasmática y generalmente una delgada pared formando la célula generativa. La célula generativa se divide para formar dos espermias generalmente en el tubo polínico pero en algunas especies en el polen. El grano de polen y el tubo polínico constituyen el gametofito masculino completo en las angiospermas. Así, el gametofito masculino maduro consiste de un total de tres células: el tubo polínico y 2 espermias (Figura 2.2).

La pared del grano de polen está compuesta de una pared externa, la exina y una pared interna lisa, la intina, compuesta de celulosa.

2.4.2. OVULO Y MEGAGAMETOFITO

Dentro del ovario, en la base del carpelo están los óvulos. El ovario es hueco y los óvulos están unidos al ovario por un corto tallo llamado funículo.

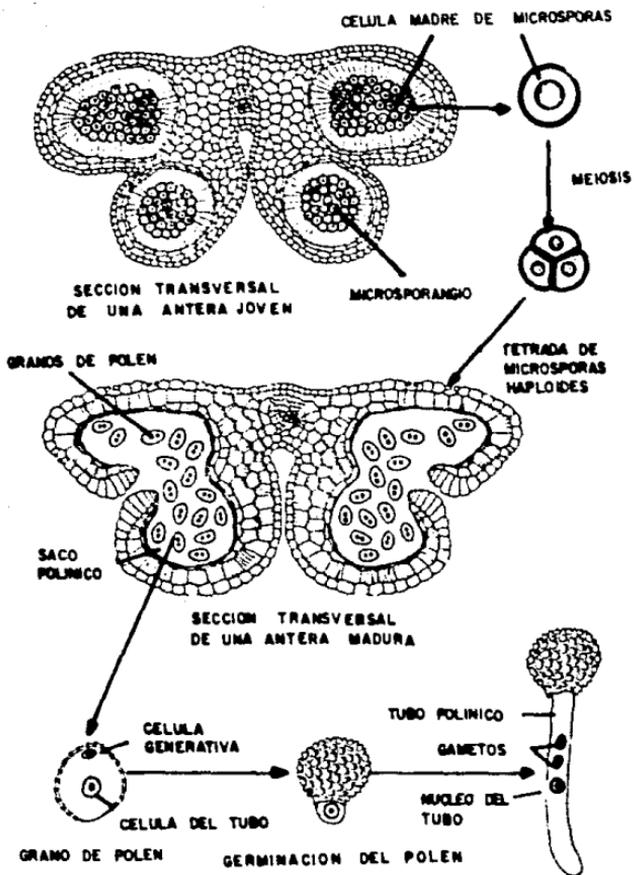


FIG. 2.2

EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN. (WILSON Y LOOMIS, 1980)

Cada óvulo consiste de una nucela rodeada por dos integumentos (el externo y el interno) o solo uno. El canal hacia el ápice donde los integumentos no vienen juntos es el micrópilo a través del cual el tubo polínico crece en una ruta hacia el megagametofito. El desarrollo del gametofito comienza con la diferenciación de un solo megasporocito o célula madre de la megaspora que tiene $2n$ cromosomas dentro de la nucela. Esta célula se alarga y sufre meiosis. De las cuatro megasporas (con n cromosomas), tres degeneran. La cuarta comienza a alargarse y sufre una serie de divisiones mitóticas. Las divisiones usualmente resulta en ocho núcleos haploides que son organizados en siete células.

Tres células conocidas como aparato ovocelular, son localizadas en el extremo del gametofito cerca del micrópilo: la célula huevo y las dos sinérgidas. Las sinérgidas juegan un papel importante en la entrada del tubo polínico en el megagametofito. En el otro extremo del megagametofito (o saco embrionario, como comunmente se le llama) están tres células llamadas las antípodas. Su función es aún desconocida. (Figura 2.3).

La célula huevo, dos sinérgidas, y tres antípodas aportan 6 de los 8 núcleos presentes en el saco embrionario. Los dos restantes están en la célula central. Estos dos núcleos tienen un nombre especial: núcleos polares. (Jenssen and Salisbury, 1984).

2.4.3. POLINIZACION

Para que una angiosperma se reproduzca sexualmente, el polen debe ser transferido de la antera al estigma (acto conocido como polinización). El polen puede entonces germinar y el tubo polínico alcanza el saco embrionario donde ocurre la fertilización.

Polinización, la transferencia de polen, no es lo mismo que fertilización, la unión de núcleos gaméticos.

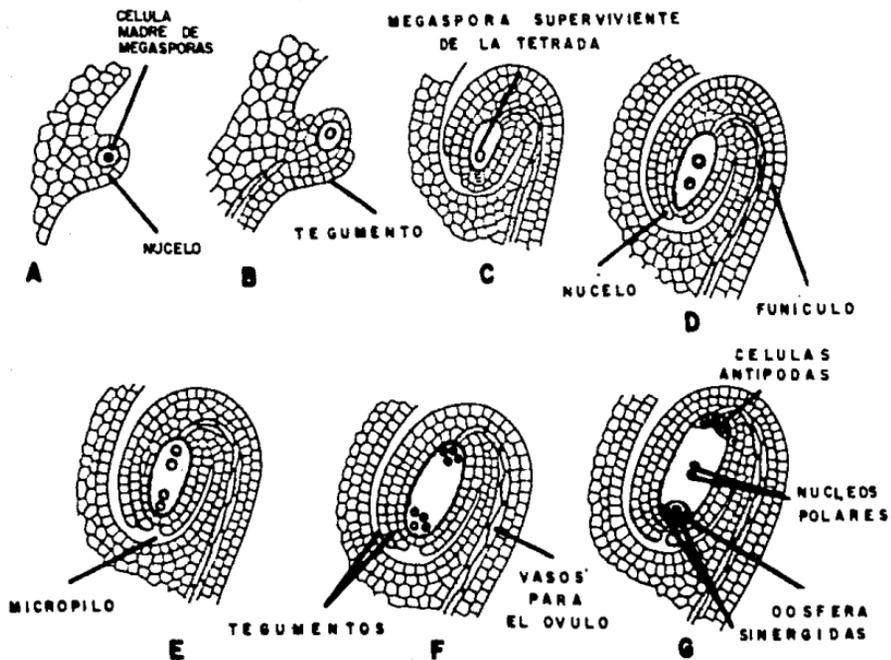


FIG. 2.3 DESARROLLO DEL OVULO (WILSON Y LOOMIS, 1980)

2.4.4. DOBLE FERTILIZACION

El tubo polínico crece hacia el estilo, entra al ovario creciendo a lo largo de la pared, creciendo hacia el funículo, y usualmente entra al óvulo a través del micrópilo. Este continúa creciendo hacia la nucela y alcanza el saco embrionario. Aquí el extremo del tubo polínico crece dentro de una de las dos sinérgidas y descarga los dos espermias y el núcleo vegetativo. Uno de los dos espermias, o al menos el núcleo, entra a la célula huevo. La célula huevo y el primer núcleo espermático se fusionan produciendo el cigoto, mientras que el segundo núcleo espermático se fusiona con los dos núcleos polares para formar el núcleo primario del endospermo. Esto es conocido como doble fertilización (un fenómeno que ocurre solo en las angiospermas). El resultado de la doble fertilización es el cigoto diploide y el endospermo generalmente triploide. (Figura 2.4) (Jenssen and Salisbury, 1984).

2.4.5. CIGOTO Y EMBRION

El cigoto siempre se divide desigualmente. La pequeña célula terminal forma la parte del embrión que se continúa dividiendo y se desarrolla en el embrión maduro de la semilla. La célula grande basal se divide un número limitado de veces y da origen al suspensor (una estructura que aparentemente funciona en la conducción de materiales para el desarrollo del embrión).

En el desarrollo temprano del embrión se forma primero una masa globular de células. El primer tejido diferenciado es el protodermo (el cual llega a ser la epidermis del embrión). En el caso de las dicotiledóneas, dos centros de división hacen que se establezca el comienzo de los cotiledones y se origina el embrión en forma de corazón. Divisiones continuas resultan en un embrión elongado (torpedo) en muchas, pero no en todas las dicotiledóneas. Ahora, las regiones apical y radicular son claramente definidas, y el comienzo de la diferenciación celular puede ser visto. El embrión maduro tiene dos cotiledones: un

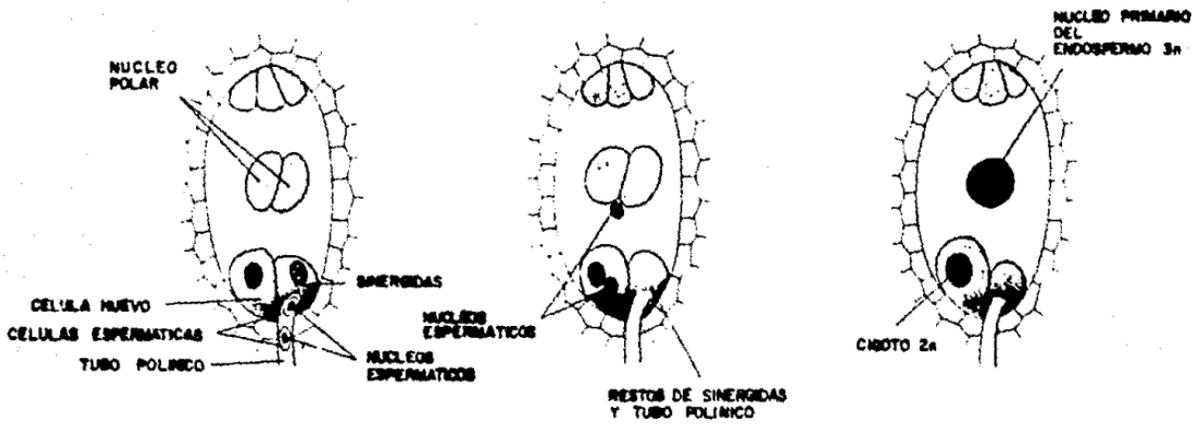


FIG. 2.4

EVENTOS DE LA DOBLE FERTILIZACION. (JENSEN AND SOLIBURY, 1984)

extremo apical que puede tener algunas hojas pequeñas en muchas especies y un extremo radicular con una cubierta. Muchas semillas acumulan alimento en los cotiledones para soportar el desarrollo del embrión después de la germinación. (Jenssen y Salisbury, 1984).

2.4.6. SINTESIS Y ACUMULACION DE MATERIAL DE RESERVA

Durante el desarrollo de los cotiledones, lo que ocurre posteriormente a la formación de protuberancias en el embrión corazón, es un cambio en el patrón de crecimiento, de división celular a elongación celular y es en este punto cuando la síntesis y la acumulación de material de reserva se inicia en los cotiledones; es decir, el número final de células del embrión es alcanzado muy pronto durante la ontogenia, y el subsecuente incremento en la masa celular, es el resultado de la expansión y el concomitante depósito de almidón y proteínas de reserva (Figura 2.5) (Millerd 1973 en Villegas, 1986).

2.5. PARALELISMO ENTRE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA Y LA CIGOTICA

Como se describió, durante la embriogénesis sexual ocurren varios cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos importantes que pueden ser tomados como patrón de referencia para saber que tanto el sistema de embriogénesis somática en alfalfa se acerca a la realidad y poder así considerarlo como modelo.

En datos reportados por Crouch and Sussex, 1981; Crouch et al., 1982; Stuart et al., 1985; Shoemaker, 1987 y otros trabajos realizados en el laboratorio (Hernandez, 1989) se sabe que el patrón morfológico de la embriogénesis somática es muy paralelo al que se observa durante el desarrollo de la semilla, es decir, pasan por los mismos estados de desarrollo: globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Figura 2.6)

Durante el desarrollo de la semilla, los cotiledones acumulan una fuente de nutrientes, siendo gradualmente digeridos como proceso de desarrollo. Sin embargo, en el sistema de embriones

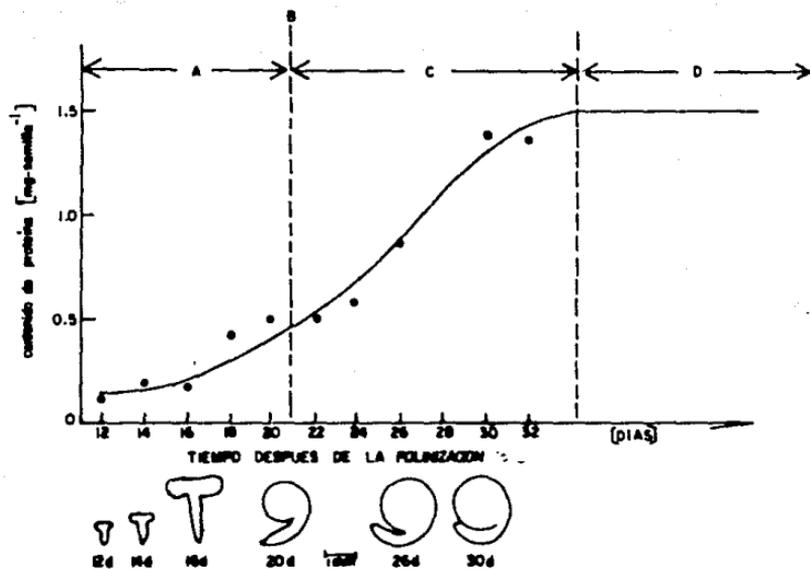


FIG. 2.5

ACUMULACION DE PROTEINA Y DESARROLLO MORFOLOGICO DE LOS EMBRIONES EN LA MADURACION DE LA SEMILLA DE MOSTAZA (BERGFELD R. et al 1987).

A. DIVISION CELULAR RAPIDA, CRECIMIENTO DE LA TESTA Y EL ENDOSPERMO, SINTESIS DE PRECURSORES.

B. CESA LA DIVISION CELULAR.

C. ALMACENAMIENTO DE MATERIAL DE RESERVA.

D. DESECACION

(VILLEGAS T. 1986)

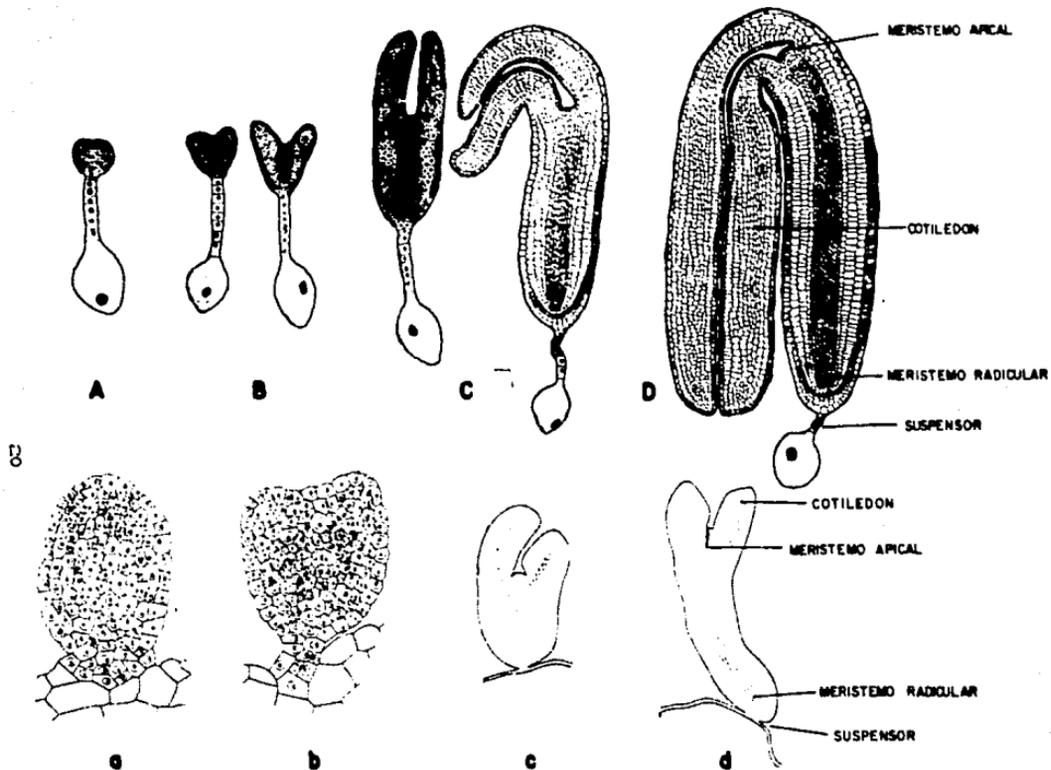


FIG. 2.6

ONTOGENA DE LOS EMBRIONES SOMATICOS (a-d) Y CIGOTICOS (A-D). A,a-ETAPA GLOBULAR; B,b-CORAZON; C,c-TORPEDO Y D,d-COTILEDONAR (RAGHAVAN V. 1976)

somáticos los nutrientes son tomados del medio y, por lo tanto no hay un equivalente directo con los cotiledones cigóticos. Es por esto que en el sistema de embriogénesis somática en alfalfa se pueden observar algunas diferencias morfológicas durante el desarrollo de los cotiledones. En los embriones somáticos, los cotiledones son muy pequeños en comparación con los de los embriones cigóticos.

A nivel fisiológico, también se ha encontrado cierto paralelismo en cuanto a su capacidad para germinar, es decir, los embriones somáticos son igualmente capaces de germinar como lo hacen los embriones cigóticos. Sin embargo, los embriones somáticos tienen una desventaja con respecto a la semilla que es la falta de latencia por largos periodos de tiempo como lo hace la semilla, por lo que ha sido imposible llevar a cabo su secado y encapsulación. Se sabe que una de las causas de esta falta de latencia está en relación con la cantidad de material de reserva acumulado, pues aunque la acumulación de proteína de reserva de los embriones somáticos sigue el mismo patrón observado que en el sistema cigótico, los niveles finales de acumulación en los embriones somáticos es mucho menor. Esto puede ser explicado sobre las bases del tamaño de los cotiledones ya que los niveles finales de proteína de reserva acumulada en la semilla ocurre en los cotiledones.

De lo anterior se deduce que algo debe estar ocurriendo en los embriones somáticos por lo que no logran acumular una cantidad adecuada de material de reserva, suficiente para entrar en latencia por largos periodos de tiempo como lo hace la semilla.

Por esto Stuart et al., 1985, han sugerido desarrollar un criterio más bioquímico para poder conocer el grado de paralelismo que existe entre los dos sistemas, que además permita evaluar la calidad de los embriones, para poder predecir y cuantificar que tratamientos mejoran la fisiología y calidad de los mismos y propone a las proteínas de reserva como excelentes marcadores bioquímicos de la embriogénesis. Las proteínas de reserva reúnen

ciertas características importantes, son específicas de embriones y su síntesis representa una expresión única en el tiempo de pocos genes en un solo punto durante el desarrollo de la semilla y dentro del ciclo de vida de la planta, expresión que está regulada por la diferenciación y es altamente específica de tejido.

La expresión y acumulación de las proteínas de reserva son de interés para cuantificar el grado de similitud entre los embriones somáticos *in vitro* con su contraparte en los embriones cigóticos desarrollados en forma natural y poder saber si los embriones somáticos y cigóticos son bioquímicamente similares.

2.6. PROTEINAS DE RESERVA

El estudio de las proteínas de reserva tiene un doble interés. Por un lado son un componente importante en la nutrición tanto de humanos como de animales, por otro lado, es un sistema atractivo para el estudio de expresión genica diferencial (Pernollet, 1985).

Las proteínas presentes en los embriones en desarrollo son de dos tipos (Danielson, 1976 en Villegas, 1986): Proteínas metabólicas que pueden ser enzimáticas o estructurales, que están relacionadas con las actividades normales de la célula, incluyendo la síntesis del segundo tipo, las proteínas de reserva, estas proteínas junto con reservas de carbohidratos y lípidos son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla.

Las proteínas de reserva de semilla pueden ser definidas como "proteína acumulada en cantidades significativas en el desarrollo de la semilla las cuales son rápidamente hidrolizadas para proporcionar una fuente de nitrógeno reducido para los estados tempranos del crecimiento de la planta" (Higgs, 1984).

Por razones operacionales, las proteínas de reserva de semilla pueden ser divididas en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad: albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas las cuales son solubles en agua, soluciones salinas, soluciones alcohólicas y soluciones ácidas o alcalinas respectivamente. Aunque hay excepciones, la mayoría de las proteínas de leguminosas y otras

plantas dicotiledóneas son las globulinas y de las plantas monocotiledóneas son las prolaminas y las gluteinas (Higgin, 1984).

Las globulinas se dividen a su vez en dos familias principales que son denominadas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación en gradientes de sacarosa: 7S (7-9S) y 11S (10-14S). Ambas clases de proteínas son oligoméricas, su estructura cuaternaria generalmente está basada en un trimero o múltiplos de trimeros. En la tabla II.1 se resumen las características específicas de las proteínas de reserva de alfalfa.

TABLA II.1 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE ALFALFA

Proteína 7S

- Soluble en solución salina baja , pH 7
- Compuesta de una serie de bandas de 68 K (tripleto), 52 K, 38 K, y 32 K.
- Purificación:
Filtración en gel (A-0.5M) o sedimentación.
Cambio iónico (DEAE, pH 5.5).

Proteína 11S

- Soluble en: pH 7, NaCl. 1 a 10 mM DTI
pH 3, solución salina baja
pH 9, solución salina baja
 - Compuesto de una serie de bandas de 47 K (tripleto), 39 K, 22 K, y 20 K.
 - Purificación:
Lavados extensivos del botón seguido por una solubilización específica.
Filtración en gel (A-1.5 M. pH 3 o pH 9) o sedimentación .
-

(Stuart, D. A. et al., 1985).

2.6.1. GLOBULINAS DEL TIPO 11S

El rango de peso molecular de estas proteínas va de 300-450 KD (Higgins, 1984; Villegas, 1986; Krochko J.E. and Bewley J.D.1988) y tienen un punto isoeléctrico de 4.5 a 5.

Está compuesta de 12 subunidades (Catsimpooolas et al., 1967 en Pernollet and Mossé, 1983) correspondiendo a 6 diferentes tipos de cadenas polipeptídicas (Catsimpooolas et al., 1971 en Pernollet, and Mosee, 1983) con un peso molecular cerca de 22000 y 37000. Las subunidades parecen estar libres de carbohidratos (Koshiyama y Fukushima, 1976 a). Por su análisis en la composición de aminoácidos, ha facilitado su división en dos grupos: tres subunidades ácidas y tres subunidades básicas.

Badley et al., 1985 demostraron que las 12 subunidades son realmente empaquetadas en dos hexágonos idénticos colocados uno sobre otro de tal modo que cada subunidad ácida está asociada a 3 básicas y viceversa; dos en el mismo hexágono y el tercero en el otro. La estructura involucrada es aproximadamente similar a un cilindro achatado. Pernollet y Mosse, 1983 sugieren que algunos puentes disulfuro intercadena podrían existir entre algunas de las subunidades.

En la figura 2.7 se ilustra un modelo general de la estructura cuaternaria de legumin. La molécula de legumin es un polímero formado por la asociación de 6 monómeros. Cada monómero es una proteína bicatenaria. Las dos cadenas (Una subunidad ácida y una básica) están frecuentemente asociadas por uno o más puentes disulfuro, ellos pueden ser separados por un agente reductor y da origen a las subunidades ácidas y básicas. Estas subunidades son producto de familia de multígenos.

2.6.2. GLOBULINAS DEL TIPO 7S

El rango de peso molecular es de 150 a 200 KD (Krochko J.E. y Bewley J.D., 1984) (Higgins, 1984) (Villegas, 1986), con punto isoeléctrico entre 5 y 6. Están menos definidos en cuanto a su constitución, el modelo más aceptado es que son asociaciones no

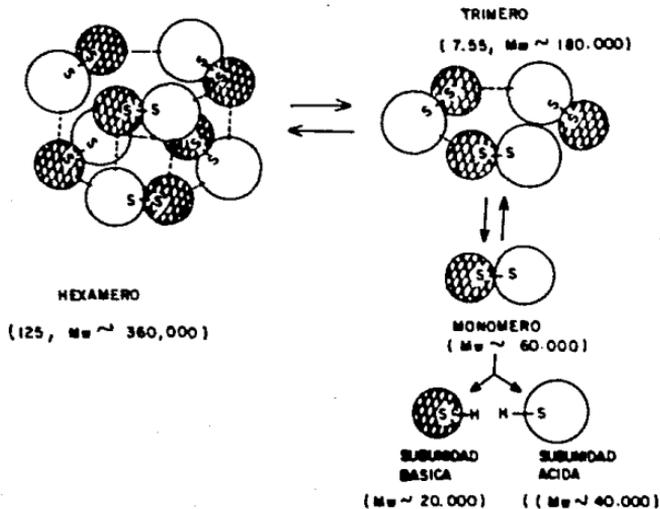


FIG. 2.7

MODELO ESQUEMATICO DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LEGUMIN. LINEA PUNTEADA UNIONES NO COVALENTES; S-S, PUENTES DISULFURO.
(PERVOLLET, J.C. Y MOSSE J. 1983)

equimolares de polipeptidos de 70 KD, 50 KD y 25 KD. Los cuales muestran heterogeneidad de carga y tamaño, siendo también codificadas por familias de multigenes.

En relación con su estructura cuaternaria, frecuentemente aparece como homo o heterotrímero algunas veces capaces de asociarse en hexámero (Pernollet, y Mosee J. 1983).

2.7. CUERPOS PROTEICOS Y SU RELACION CON LAS PROTEINAS DE RESERVA

La semilla difiere de otros tejidos por su alto contenido de material de reserva: almidón, lípidos y ciertas proteínas no enzimáticas -las proteínas de reserva (Ericson M.L. et al., 1989), las cuales pueden ser definidas como proteína que se acumula en cantidades significativas en el desarrollo de la semilla, son estables durante el desarrollo que separa la embriogénesis de la germinación y crecimiento de la planta para proporcionar una fuente de esqueletos de carbono y nitrógeno reducido; el nitrógeno principalmente en forma de proteínas; el carbono en forma de almidón y/o lípidos (Derbyshire et al., 1976; Higgis, 1984). Se ha encontrado que las proteínas de reserva están estrictamente confinadas al periodo de maduración de la semilla (Fisher, 1987). Estas son sintetizadas durante el crecimiento del embrión en un periodo de una muy alta actividad biosintética y son subsecuentemente transportadas de su sitio de síntesis a su sitio de almacen, los cuerpos proteicos (órganos rodeados por membrana de 0.8 a 12 μm de diámetro) (Ericson, et al. 1989); (Lending et al., 1989); (Kim, 1988); (Greenwood y Chrispeels, 1985) y (Chrispeels, 1984).

El control de la expresión de los genes de las proteínas de reserva durante el ciclo de vida de la planta es de gran interés. Se ha encontrado que está estrictamente confinado al periodo de maduración de la semilla. Durante el resto de vida de la planta, los genes de las proteínas de reserva parece que están reprimidos por un mecanismo hasta ahora desconocido. Generalmente se asume que, con la desecación de la semilla irreversiblemente termina el

periodo de maduración y reorienta el programa de desarrollo, después de un estado metabólicamente quiescente, hacia una expresión de aquellos genes, los cuales están dirigiendo la germinación y el crecimiento de la planta (Fisher et al., 1987); (Croissant-Sych y Bopp, 1988).

En muchas dicotiledóneas como las leguminosas las principales proteínas de reserva son las globulinas. Estas son sintetizadas predominantemente en las células de parénquima de los cotiledones durante el desarrollo del embrión.

En contraste con las dicotiledóneas, muchos cereales tienen proteínas de reserva llamadas prolaminas, las cuales, son sintetizadas en el endospermo.

Evidencias bioquímicas recientes confirman que los polisomas (ribosomas) unidos a la membrana del retículo endoplásmico es el sitio de síntesis de las proteínas de reserva, aunque no hay evidencias experimentales firmes que comprueben que este es el sitio de formación de las proteínas de reserva a lo largo del estado de desarrollo de los embriones durante el tiempo que la síntesis y el depósito de globulinas toma lugar, ya que los polisomas nunca se han observado unidos a la superficie exterior de la membrana de los cuerpos proteicos, igual que como ocurre con los cuerpos proteicos durante el desarrollo del endospermo de maíz.

Durante el desarrollo de las semillas de leguminosas, en las células del cotiledón, las proteínas de reserva deben ser transportadas de su sitio de síntesis a los cuerpos proteicos (Lending et al., 1988); (Adler y Müntz, 1983).

En general los cuerpos proteicos son pequeños más o menos esféricos y rodeados por una membrana. Están compuestos de proteína de reserva (70-80% de peso seco), sales de ácido fítico (10% del peso seco), enzimas hidrolíticas, cationes y ácidos ribonucleicos. La presencia de compuestos tales como carbohidratos, sales de ácido oxálico, y lípidos son menos importantes y mas variables (Pernollet, 1978).

El origen de los cuerpos proteicos durante mucho tiempo ha sido objeto de controversia.

Se han propuesto dos diferentes mecanismos de formación de los cuerpos proteicos, los cuales han sido apoyados por algunas evidencias experimentales:

- i) Los cuerpos proteicos descienden de una gran vacuola la cual esta presente en las células del cotiledón en el desarrollo de la semilla de leguminosas en el comienzo del estado de desarrollo del embrión. Las proteínas son depositadas dentro de estas vacuolas. Los depósitos proteicos vacuolares incluyen a las globulinas. Estas vacuolas parecen ser transformadas a cuerpos proteicos por fragmentación lo cual ocurre poco después del inicio de la formación de las proteínas de reserva (Gayler et al. 1989); (Craig 1979, 1980 citado por Adler, 1983).
- ii) Los cuerpos proteicos se originan en el retículo endoplásmico. Los polipéptidos de las proteínas de reserva son descargados de los polisomas unidos a la membrana y segregados en el lumen del retículo endoplásmico rugoso (Adler y Müntz, 1983); (Ericson et al. 1989), donde estos son ensamblados en los cuerpos proteicos (Craig et al. 1980); (Lending et al. 1988).

Basados en estudios de inmunolocalización, las prolaminas parecen agregarse dentro del retículo endoplásmico rugoso, mientras que muchas de las globulinas parecen agregarse en vacuolas (Lending, 1989).

Para concentrar la proteína de reserva del retículo endoplásmico hacia la vacuola durante los tempranos periodos de acumulación, las proteínas sintetizadas por el retículo endoplásmico son pasadas al aparato de Golgi donde llegan a ser concentradas; las vesículas de Golgi son el vehículo para el transporte hacia las vacuolas existentes. Así este mecanismo de transporte involucra el flujo directo de vesículas de Golgi a la vacuola (Bergfeld et al. 1980).

El proceso de concentración en vacuolas es interrumpido cuando los embriones llegan a un estado quiescente durante la desecación de la semilla. Este proceso continúa hasta antes de la germinación cuando las proteínas de reserva llegan a ser digeridas y la reducción de los cuerpos proteicos por coalescencia hasta formar finalmente una sola vacuola central. Así los cuerpos proteicos pueden ser considerados como un estado transitorio del desarrollo vacuolar de las células de reserva, las cuales se desarrollan en células asimilatorias ordinarias después que su material de reserva ha sido consumido (Bergfeld et al., 1980).

La acumulación de proteínas de reserva en los cuerpos proteicos, que ocurre durante el desarrollo de la semilla, es un aspecto importante para la vida de la planta, así como para el hombre, y debe ser considerado si se desea producir embriones somáticos enfocados a la producción de semillas artificiales.

Para que un embrión somático pueda ser considerado similar a una semilla y de la misma calidad, este deberá seguir el mismo patrón de acumulación de proteínas dentro de los cuerpos proteicos y en el mismo nivel como se presenta en la semilla, lo cual también le permitiría entrar en latencia por largos periodos de tiempo.

Se ha reportado que en los embriones somáticos hay una síntesis de estas proteínas de reserva pero sus niveles finales de acumulación son mucho más bajos que en la semilla; sin embargo, aún no se conocen cuales son los factores que impiden que se lleve a cabo la acumulación dentro de los cuerpos proteicos.

2.8. REGULACION DEL METABOLISMO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN LOS COTILEDONES

Los cotiledones de semillas de leguminosas son ricos en proteínas de reserva, las cuales son metabolizadas durante el crecimiento de la plántula ya que este crecimiento es acompañado por un incremento en la actividad proteolítica en los cotiledones debido a la aparición de una proteasa con actividad endopeptidasa.

Estudios ultraestructurales sugieren que la proteólisis ocurre

dentro de los cuerpos proteicos dado que las membranas que los rodean aparentemente aparecen intactas durante el proceso de digestión.

Los cotiledones de semillas de leguminosas contienen gran cantidad de inhibidores de proteasas las cuales disminuyen durante el temprano crecimiento de la planta. Esto sugiere que el comienzo del metabolismo de las proteínas de reserva en las plantas es debido a la activación de proteasas en los cuerpos proteicos y que esta activación está causalmente relacionada con la disminución en la actividad de los inhibidores de proteasas. Sin embargo, tal relación causal nunca ha sido establecida y no ha sido demostrada la proteólisis autolítica en cuerpos proteicos aislados.

En apoyo a un mecanismo de control completamente diferente para el metabolismo de las proteínas de reserva Chrispeels et al., 1976 demostraron que la endopeptidasa responsable del rompimiento de las proteínas de reserva es sintetizada de novo y llega a ser asociada con los cuerpos proteicos.

La síntesis de la enzima ocurre en los polisomas unidos al retículo endoplásmico y el transporte de la enzima a los cuerpos proteicos es mediada por las cisternas del retículo endoplásmico (Chrispeels, 1980/81). Esto fue sugerido por evidencias ultraestructurales en donde se muestra que el retículo endoplásmico rugoso prolifera y puede dar origen a vesículas, las cuales se fusionan con los cuerpos proteicos previo a la digestión de las proteínas de reserva.

Los cuerpos proteicos son generalmente considerados parte del compartimento lítico de la célula vegetal y estas vesículas pueden representar lisosomas primarios los cuales transportan las enzimas de su sitio de síntesis a su sitio de acción; es decir, del retículo endoplásmico a los cuerpos proteicos. (Chrispeels et al., 1976); (Chrispeels, 1980/81); (Gayler et al., 1989).

2.9. CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS MEDIANTE GELES DE POLIACRILAMIDA

Para poder analizar con cierta aproximación los diferentes polipéptidos que están relacionados con una familia de multigenes la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida resulta ser una herramienta muy útil.

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas, en una solución bajo la influencia de un campo eléctrico.

La migración de partículas cargadas en una solución por la acción de un campo eléctrico puede estudiarse en medios libres o en soluciones amortiguadoras empleando diversos soportes como el papel filtro, agar, acetato de celulosa, gel de almidón, gel de poliacrilamida, etc.

El gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es uno de los mejores métodos para la separación de proteínas. Su característica principal reside fundamentalmente en su gran poder de resolución por sus efectos de tamiz molecular y además por ser un gel inerte, estable, firme, de gran transparencia y sumamente manuable. Permite a través de etapas adicionales la definición de especificidad de anticuerpos.

La poliacrilamida es una polimerización producto de una unión cruzada de acrilamida y N,N'-metileno bisacrilamida (Bis). La polimerización es iniciada por el sistema catalizador-redox tal como el persulfato de amonio-N,N,N',N'-tetrametileno diamina (TEMED) o riboflavina TEMED. La ventaja está en que al cambiar la la concentración de la mezcla de acrilamida y bisacrilamida, se modifica la estructura molecular del gel aumentando o disminuyendo su poro de filtración.

Cuando las proteínas son hervidas en presencia de SDS y agentes reductores como β -mercapto son desnaturalizadas. La unión con el SDS proporciona una carga negativa uniforme que les permite migrar a través de la matriz de poliacrilamida, su movilidad es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Al final de la corrida las moléculas pequeñas han corrido más rápido

a lo largo de la trayectoria en el gel, las moléculas más grandes han corrido menos y cada constituyente después de tefir las proteínas puede ser comparado con marcadores de peso molecular que corren en una trayectoria de referencia y tamaño molecular (KD) asignado. Para tener una máxima resolución de bandas en el gel de corrida, la mezcla de proteínas son aplicadas a bandas más estrechas del gel concentrador (usando un peine para preparar las trayectorias). El gel concentrador con menos acrilamida y mínima propiedad de tamiz, formado con un sistema de amortiguador discontinuo de cloruro y glicina a pH 6.8 forma una frontera acumulando las proteínas contenidas en una estrecha zona antes de entrar en el gel de resolución.

2.10. EL USO DE ANTICUERPOS

Estudios preliminares nos han indicado que durante la embriogénesis somática se involucran mecanismos bioquímicos similares a los que se dan en los embriones sexuales como es la acumulación de proteínas de reserva. Sin embargo, una forma de asegurarnos que se trata del mismo tipo de proteínas es mediante la obtención de anticuerpos contra esas proteínas de semilla y si los anticuerpos reaccionan contra las proteínas producidas por los embriones somáticos significa entonces que son del mismo tipo. Esta técnica nos permite, además, conocer los niveles de acumulación de estas proteínas.

La producción de anticuerpos plantea un método general para la detección de macromoléculas en tejidos y células vegetales. Esta técnica representa una considerable ventaja en especificidad sobre métodos citoquímicos convencionales (para localizar e identificar antígenos en tejidos vegetales), la cual es directa contra grupos químicos particulares y clases de moléculas y son visualizadas después de la reacción con tinciones específicas las cuales se unen a estos grupos.

Actualmente las técnicas inmunológicas tienen un gran incremento en el número de aplicaciones en el estudio de sistemas

vegetales. La inmunocitoquímica vegetal está bien establecida a nivel de microscopía de luz y existe la tendencia a hacer estudios exploratorios a nivel de ultraestructura. Al mismo tiempo los estudios inmunocitoquímicos en plantas puede dar única información acerca de:

- 1.- Localización de células específicas o contenidos celulares de determinadas macromoléculas.
- 2.- Detección de cambios en la distribución celular de las macromoléculas durante el desarrollo.
- 3.- Identificación de los sitios subcelulares de determinadas macromoléculas con una resolución especial a nivel de microscopía de luz.
- 4.- Identificación a nivel de ultraestructura de organelos particulares sintetizadores de diferentes macromoléculas o en los cuales estas puedan estar secuestradas en la célula (Knox, 1982).

2.10.1. ANTIGENO

Es definido como una sustancia exógena capaz de inducir una respuesta inmuno-específica en cualquier tipo de vertebrado inmunocompetente. Los antígenos en general no tienen una característica o una composición química específica que los distinguen de sustancias análogas que no sean antigénicas; por lo tanto, la definición de un antígeno es enteramente operacional y depende de si la sustancia en cuestión estimula una respuesta inmune (Benacerraf y Unanue, 1979).

Cualquier molécula puede constituir un antígeno siempre y cuando tenga zonas contra las cuales vayan dirigidas las respuestas inmunes y con las cuales se una a los anticuerpos, a estas zonas se les denomina determinantes antigénicos (Cunningham, 1978).

Algunos factores importantes que participan en la inmunogenicidad de los antígenos son: la composición del antígeno, la vía de administración, la dosis del antígeno, lo extraño del

antígeno para el receptor, edad y sexo del receptor, el tamaño y metabolismo del antígeno, el uso de adyuvantes y el estado físico del receptor (Ortiz, 1987).

La vía de administración y la dosis del antígeno determinan su inmunogenicidad; es decir, el mecanismo por el cual el antígeno es procesado, influye en la respuesta inmune.

2.10.1.1. USO DE ADYUVANTES

El uso de sustancias capaces de potenciar la respuesta inmunitaria (adyuvantes), modifica la inmunogenicidad de un antígeno.

Se han descrito varias sustancias que aumentan la inmunogenicidad de los antígenos, como las emulsiones oleosas y el hidróxido de aluminio. Estas sustancias, llamadas adyuvantes, no sólo aumentan la inmunogenicidad de sustancias que ya poseen la capacidad de inducir la respuesta inmune cuando se administran en un individuo, sino que también confieren esta característica a sustancias que no la poseen; así mismo, pueden modificar el tipo de respuesta inmune hacia el inmunógeno (Ortiz 1987).

Adyuvantes como el incompleto y el completo de Freund han sido estudiados con diversos antígenos.

A) ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

Este consiste de una mezcla de aceite mineral, y una suspensión de *Micobacterium butyricum* o *Micobacterium tuberculosis* destruidas por calor. El inmunógeno en solución es emulsificado con estos componentes para producir una microgota inmunógeno/agua dentro de la fase de aceite. El adyuvante completo de Freund incrementa y prolonga la respuesta del anticuerpo. La emulsión es estable y cuando se inyecta forma un depósito de inmunógeno que es lentamente disponible. Otro principal atributo está relacionado con la actividad de la micobacteria, algunos de cuyos productos actúan como poderosos estimulantes, para las células del sistema inmune en los nódulos linfáticos locales y en el granuloma que

se forma alrededor del depósito. *M. tuberculosis* es la más potente de las dos especies de micobacterias usadas. Muchos anticuerpos son sintetizados en el granuloma y su actividad continúa tanto como persista el inmunógeno, el cual puede estar por muchos años. Por la formación del granuloma y la tendencia del adyuvante completo de Freund para producir anticuerpos hacia tejidos autoinmunogénicos este no puede ser usado en el hombre. Este adyuvante es, sin embargo, con mucho el más efectivo y más ampliamente usado para la producción rutinaria de suero en animales, contra antígenos solubles y antígenos de células emulsificadas.

B) ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND

La fase líquida de inmunógeno puede ser emulsificada con aceite sin micobacteria para proporcionar un depósito de máxima inmunización. Este también da un largo tiempo de respuesta de producción de anticuerpos ya que hay una toma gradual de inmunógeno del sitio de inyección. Sin embargo, la respuesta del adyuvante incompleto de Freund es menos segura y de orden más bajo, esto puede ser debido a que el factor que activa el granuloma no se desarrolla y persiste en el depósito de adyuvante incompleto de Freund. Puede haber diferencias en la respuesta de isotipo del anticuerpo usando exclusivamente adyuvante completo de Freund.

2.10.2. ANTICUERPO

Es una proteína producida como resultado de la introducción de algún agente extraño y que tiene la capacidad de combinarse específicamente con el antígeno que estimuló su producción. Colectivamente, las proteínas con actividad de anticuerpo son referidas como inmunoglobulinas.

Todas las moléculas de inmunoglobulinas tienen una estructura común consistiendo de cuatro cadenas polipeptídicas, dos grandes y dos pequeñas. La cadena polipeptídica grande es llamada pesada o cadena H; la más pequeña es llamada ligera o cadena L.

Las cadenas ligeras que constituyen la inmunoglobulina son de dos tipos; Kappa (K) y Lambda (λ). En una inmunoglobulina, las dos son K o las dos son λ ; no existen inmunoglobulinas híbridas. En la actualidad se conocen cinco clases de cadena pesada y, por lo tanto, cinco clases de inmunoglobulinas. Las cadenas pesadas se denominan: μ , γ , α , δ , ϵ y las inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE respectivamente. Cada una de ellas contiene dos cadenas pesadas iguales, nunca híbridas. Dentro de algunas de estas clases, existen subclases que son determinadas con base en diferencias serológicas o fisicoquímicas en las regiones constantes de las cadenas pesadas. (Benacerraf y Unanue, 1979; Ortiz, 1987).

La molécula se separa enzimáticamente en dos fragmentos, Fab y Fc. Uno de estos fragmentos mantiene la capacidad para unirse al antígeno de aquí que fuera llamado Fab (ab = antigen binding). Las dos unidades Fab se encuentran unidas entre sí por enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas. Así mismo, cada unidad Fab se encuentra unida por enlaces disulfuro entre la cadena pesada y la ligera y también por enlaces no covalentes. El otro fragmento no se combina con el antígeno pero fue cristalizable por lo tanto fue llamado fragmento Fc (c = cristalizable). (Figura 2.8).

La capacidad de una molécula de anticuerpo para combinarse con un solo determinante antigénico reside en la fracción Fab de la molécula, mientras que ciertas propiedades biológicas que determinan la posterior disposición del antígeno reside en la porción Fc (Benacerraf y Unanue, 1979).

Cada una de las cadenas polipeptídicas contiene una región amino terminal (N-terminal), conocida como región variable o V, y una región carboxiloterminial (C-terminal), llamada región constante o C. La región V es la que está implicada en la combinación con el antígeno a través de unos cuantos aminoácidos de las cadenas H y L (Región hipervariable); estas se encuentran especialmente cercanas entre sí debido a la conformación de la inmunoglobulina (Ortiz, 1987), (figuras 2.8 y 2.9).

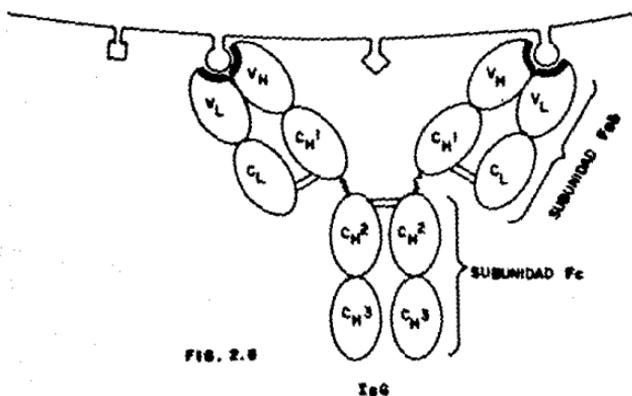


FIG. 2.8

IgG

ESTRUCTURA DE LA INMUNOGLOBULINA IgG. ES UNA MOLECULA PROTEICA CONSTA DE DOS PARES DE CADENAS POLIPEPTICAS, LIGERAS Y PESADAS, UNIDAS POR ENLACES DISULFURO EN UNA ESTRUCTURA EN FORMA DE "Y". ESTA ESTRUCTURA ESTA FORMADA POR TRES FRAGMENTOS: UN FRAGMENTO Fc (EL PIE DE LA MOLECULA EN FORMA DE "Y") Y DOS FRAGMENTOS IDENTICOS Fab (LOS BRAZOS DE LA "Y"). LAS DOS ZONAS SITUADAS EN LA PUNTA DE CADA FRAGMENTO Fab (V_H y V_L) VARIAN EN LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS SEGUN LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO, POR LO CUAL SE DENOMINAN ZONAS VARIABLES; LA MAYORIA DE LAS ZONAS RESTANTES DE CADA CADENA NO VARIAN Y, POR ELLO, SE LLAMAN ZONAS CONSTANTES. LAS CADENAS LATERALES DE AMINOACIDOS DE LAS ZONAS VARIABLES CONTRIBUYEN A LA FORMACION DEL LADO DE UNION QUE ES GEOMETRICO Y, QUIMICAMENTE, COMPLEMENTARIO DE UN TIPO DE ANTIGENO, CREANDO UN INTIMO ACOPLAMIENTO CAVIDAD- ANTIGENO. (CAPRA DONAL 1977)

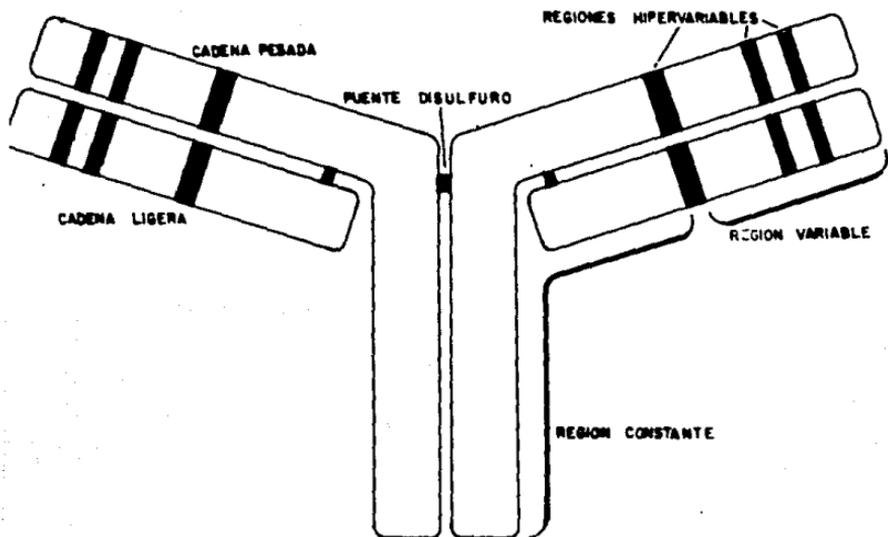


FIG. 2.9

ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO:

CADA CADENA PROTEINICA TIENE UNA REGION VARIABLE Y UNA CONSTANTE. LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS REGIONES VARIABLES ES PECULIAR DE CADA ANTICUERPO, MIENTRAS QUE LAS REGIONES CONSTANTES SON LAS MISMAS EN TODOS LOS ANTICUERPOS DE UN TIPO DETERMINADO. LAS REGIONES VARIABLES RECONOCEN Y SE UNEN A UN ANTIGENO ESPECIFICO; LAS CONSTANTES REALIZAN TAREAS INMUNOLOGICAS. (LEDER PHILIP 1982)

2.10.2.1. DIFERENTES TIPOS DE ANTICUERPOS

En la exploración de las propiedades de uniones específicas de un anticuerpo se puede elegir entre dos formas muy diferentes de anticuerpos, hay anticuerpos policlonales convencionales y anticuerpos monoclonales. Estos son preparados en una ruta diferente para satisfacer diferentes demandas.

A) ANTICUERPO MONOCLONAL

Estos son derivados de una sola célula inmortalizada, produciendo anticuerpos por fusión de un linfocito B con una línea de células tumorales para formar clones "hibridomas". El anticuerpo secretado es homogéneo en especificidad, afinidad e isotipo y cada producto monoclonal es específico a un solo determinante antigénico del inmunógeno (monoespecífico). Cada anticuerpo monoclonal puede ser preparado en cantidades teóricamente ilimitadas para pruebas estándar universales. La aplicación de estos anticuerpos se ha extendido rápidamente. En las áreas de inmunología y microbiología la contribución de los monoclonales como prueba es muy significativa. Su principal valor se apoya en su capacidad para seleccionar un único determinante de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales indudablemente pueden salvar los problemas de la sensibilidad y especificidad que acompaña el uso de policlonales. La principal desventaja de los anticuerpos monoclonales es que, debido a su monoespecificidad, ellos carecen, o tienen pobres propiedades de precipitación (Catty D., 1988).

B) ANTICUERPO POLICLONAL

Es un suero convencional producto de una inmunización animal, usualmente conejo, cabra o chivo. Este contiene muchos diferentes anticuerpos específicos hacia varios epitopes del complejo estructural inmunógeno. La principal ventaja de este suero policlonal es su capacidad para formar un gran complejo

inmunesoluble con el antígeno, o para una rápida aglutinación de células, por lo tanto, las reacciones pueden ser vistas y medidas visualmente o determinadas fotométricamente. Este suero tiene ciertas limitaciones para su explotación en inmunoensayos, siendo una de las principales su heterogeneidad en especificidad cuando reacciona con antígenos pequeños y su variabilidad entre animales. El antisuero es el producto de muchos clones celulares y es en consecuencia, heterogéneo en muchos niveles: en las clases y subclases (isotipos) de los anticuerpos producidos, en su especificidad, en el título y en el grado de afinidad. En un antisuero puede haber muchos anticuerpos para muchos antígenos (multiespecíficos o poliespecíficos), o para unos pocos antígenos (oligospecíficos) o para un solo antígeno (uniespecífico). En suma la respuesta a epitopes individuales pueden ser clonalmente diversos, y anticuerpos de diferente afinidad pueden competir por el mismo epitope (Catty, D. 1988).

El antisuero policlonal a pesar de sus aparentes desventajas es esencial para estudios preliminares y de sondeo por su facilidad de producción en cortos tiempos, la rápida disponibilidad del método y su capacidad para formar un gran complejo inmunesoluble con el antígeno. Ellos también tienen usualmente alta afinidad por el antígeno y la producción comercial de anti-anticuerpos que son aprovechables para inmunocitoquímica (Knox R.B., 1982).

2.10.3. REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

La forma Y básica de una molécula de inmunoglobulina es una estructura bifuncional: los brazos de la Y están principalmente relacionados con la unión antigénica mientras que la parte constante está relacionada con la capacidad de las diferentes inmunoglobulinas para interactuar con el tejido huésped (Roitt, 1987).

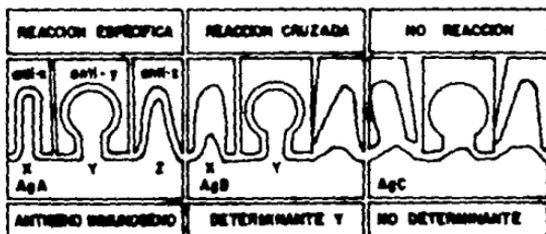
Las reacciones antígeno-anticuerpo no comprenden la totalidad de las moléculas de uno y otro componente. Sólo reacciona e interactúa una región limitada que en el antígeno recibe el nombre

de determinante antigénico y en el anticuerpo el sitio de combinación. La reacción ocurre cuando las moléculas se aproximan mucho, de modo que la conformación de la superficie en uno de los componentes es prácticamente complementaria con la conformación de la superficie del otro, y así las fuerzas de unión llamadas de corto alcance actúan y mantienen estable la combinación por enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno, enlaces dipolo-dipolo, enlaces dipolo-ion, fuerzas de Coulomb, enlaces de Van der Waals, etc. (Ortiz, 1987). Aunque las fuerzas de atracción involucradas en estas uniones son individualmente débiles en comparación con las uniones covalentes, la multiplicidad de uniones induce a una considerable energía de unión (Roitt, 1987).

2.10.4. ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Las reacciones antígeno-anticuerpo pueden mostrar un alto nivel de especificidad ya que son, sitios de acción de anticuerpos dirigidos contra determinantes de un antígeno y no son complementarios hacia determinantes de otro antígeno. La especificidad de un antisuero es el resultado de la suma de acciones de varios anticuerpos en la población total de moléculas en cada reacción con partes diferentes de una molécula antigénica.

No obstante, cuando algunos de los determinantes de un antígeno, A, son compartidos por otro antígeno B, entonces una porción de anticuerpos dirigidos hacia A también reaccionarán con B. Esta es llamada reacción cruzada, la cual se ejemplifica en la siguiente figura.



2.10.5. RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LOS ANTICUERPOS

Una característica fundamental de los organismos es su capacidad para reconocer moléculas extrañas y responder contra ellas, bien sea a través de la síntesis de proteínas de tipo inmunoglobulínico, de la producción de linfocitos sensibilizados específicos o por ambos procesos. Esta respuesta inmunitaria, que se ha dividido tradicionalmente en humoral y celular, tiene como característica principal su especificidad. Al ponerse un antígeno por primera vez en contacto con el aparato inmune de un individuo, se observa un periodo latente de varios días (tres a cuatro) durante el cual no se detectan anticuerpos ni células productoras de ellos en los tejidos linfoides. Después los anticuerpos, sobre todo de la clase IgM, comienzan a hacer su aparición en el suero y aumentan exponencialmente hasta alcanzar un máximo, para luego disminuir en forma gradual; cuando los niveles de IgM son muy bajos, se producen pequeñas cantidades de IgG. Esta forma de respuesta se conoce como respuesta primaria, y sus manifestaciones van a depender del antígeno utilizado, la dosis y la ruta de inmunización. Ahora bien, si a este individuo ya inmunizado se le deja hasta que los niveles de anticuerpo hayan desaparecido y después se le aplica una segunda dosis del mismo antígeno, la respuesta que se observa es diferente y se llama respuesta secundaria. Esta se caracteriza por ser más rápida en su desarrollo y cuantitativamente superior a la primera, debido a que el periodo latente es de menor duración. Además después de llegar al máximo, su descenso es mucho más lento y la clase de anticuerpos que predomina es IgG. Como el sistema linfóide parece "recordar" su primer contacto con el antígeno, la respuesta secundaria acelerada e intensificada puede llamarse también, respuesta anamnéstica. (Figura 2.10).

Esta capacidad para adquirir una respuesta inmunológica es otra propiedad importante de la respuesta inmunitaria.

Las dos principales clases de células mononucleares que intervienen en los procesos inmunitarios son: los linfocitos y los

RESPUESTA ANTICUERPO

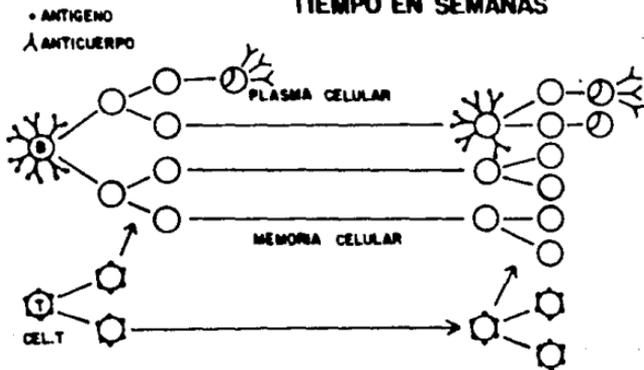
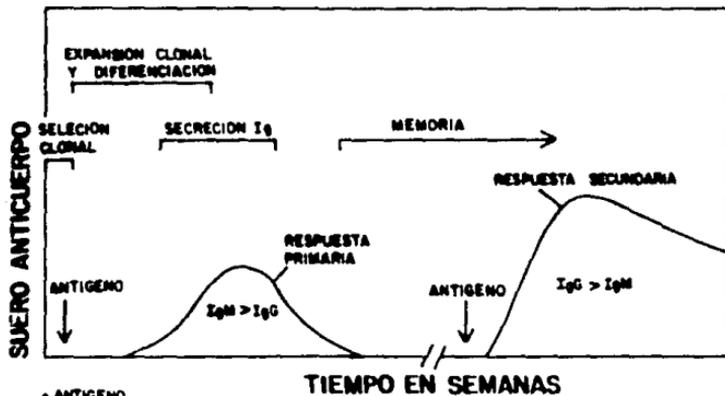


FIG. 2.10

RESPUESTA DE LOS ANTICUERPOS EN EL SUERO CONTRA UN ANTIGENO CONVENCIONAL (BENACERRAF Y UNANUE 1979)

macrófagos. Los primeros poseen la propiedad de responder de manera específica mientras que los macrófagos actúan como células accesorias y tienen un papel inespecífico (Ortiz, 1987)

2.11. METODOS INMUNOLOGICOS

La inmunología ha desarrollado sus técnicas, particularmente relacionando la interacción del antígeno con el anticuerpo. Aunque estas técnicas originalmente trazadas para inmunólogos se ha ampliado su uso a otras ciencias biológicas en donde ahora se aprecia la especificidad de unión antígeno-anticuerpo, lo cual permite una identificación exacta y la distinción de alguna molécula para la cual se haya obtenido un anticuerpo (Roitt et al., 1987).

2.11.1. INMUNODIFUSION DOBLE

La finalidad de las técnicas de inmunodifusión es identificar la reacción antígeno-anticuerpo por la reacción de precipitación. Aunque la formación de los complejos antígeno-anticuerpo, depende de electrolitos, amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo.

Las reacciones de inmunodifusión pueden clasificarse como únicas o dobles. En la inmunodifusión única el antígeno o el anticuerpo permanece fijo y el otro reactivo se mueve y se acopla con él. En la inmunodifusión doble, ambos reactivos están libres para moverse uno hacia el otro y precipitan. El movimiento en cualquier forma de inmunodifusión puede ser lineal o radial. (Fudenberg et al., 1982).

Difusión doble:

Esta técnica extremadamente útil (también llamada análisis de Ouchterlony) está basada en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden a través de un medio sólido (por ejemplo, agar) y forman complejos inmunitarios estables que pueden ser analizados visualmente.

La prueba se realiza vaciando agar fundido sobre cajas Petri o portaobjetos de vidrio y dejando que se endurezca. Se horadan pequeños pozos en el agar separados algunos milímetros. Las muestras que contienen antígenos y anticuerpos se colocan en pozos opuestos y se deja que se difundan una hacia la otra en una cámara húmeda por 18-24 horas. Las líneas de precipitación resultantes que presentan complejos antígeno-anticuerpo son analizadas visualmente (Fudenberg et al., 1982).

Entre las aplicaciones que tiene esta técnica se pueden mencionar las siguientes: a) es una prueba esencial para propiedades de precipitación, título aproximado y especificidad del antisuero para un antígeno en solución; b) prueba para la identidad antigénica, determinación de la pureza del antígeno y reacción antigénica entre moléculas, y c) una prueba aproximada de concentración de antígeno.

2.11.2. INMUNOELECTROFORESIS

En el método de inmunolectroforesis, se combina la separación electroforética de proteínas por medio de un campo eléctrico con la doble difusión en agar. En la primera fase, las proteínas del antígeno (o suero) son separadas por la corriente eléctrica. En la segunda fase de la reacción se emplea un sistema de doble difusión con el anticuerpo o anticuerpos en estudio.

Este método permite la comparación de complicadas mezclas de antígenos como sueros encontrados. (Fudenberg et al., 1982; Ortiz, 1987).

3.11.3. ELISA (Análisis inmunosorbente ligado a enzimas).

El análisis inmunitario enzimático cuantitativo ha surgido como una técnica cuantitativa para la detección de antígenos, haptenos y anticuerpos. Todos emplean enzimas diversas ligadas al antígeno o al anticuerpo como una etiqueta que puede ser hallada con facilidad mediante la medición de la actividad enzimática. (Figura 2.11).

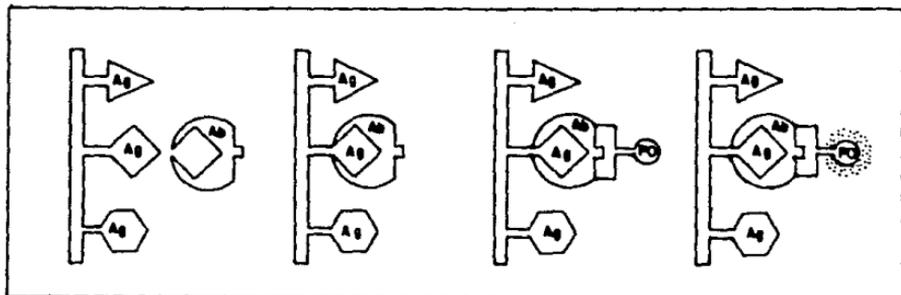


FIG. 2. 11

ELISA. ESQUEMA DEL METODO DE TINCION UTILIZANDO ANTICUERPO MARCADOS CON PEROXIDASA. EL ANTICUERPO DE CONEJO (Ab) REACCIONA UNICAMENTE CON EL ANTICUERPO ESPECIFICO (Ag). EL TERCER PASO UTILIZA ANTICUERPO DE CARNERO DIRIGIDA CONTRA EL ANTICUERPO DE CONEJO. ESTE ANTICUERPO DE CARNERO CONJUGADO CON PEROXIDAS (PO) SE UNIRA A SU ANTIGENO ESPECIFICO (EL PRIMER ANTICUERPO), INCUBANDO LA PREPARACION CON ESTE COMPLEJO EN UNA SOLUCION QUE CONTENGA PEROXIDO DE HIDROGENO SE PRODUCIRA UN DEPOSITO DE COLOR

Las múltiples variaciones de los análisis inmunológicos enzimáticos son casi todas análogas por completo al análisis inmunorradiactivo y a la inmunofluorescencia cuantitativa, siendo la diferencia obvia el uso de la etiqueta de la enzima.

El análisis ELISA puede ser empleado para medir antígenos o anticuerpos. Para medir anticuerpos, el antígeno se fija a una fase sólida, se incuba con suero de prueba y luego se incuba con una antiinmunoglobulina marcada con enzima. La actividad enzimática adherente a la fase sólida está relacionada entonces con la cantidad de anticuerpo ligado. Para medir el antígeno, el anticuerpo se enlaza a la fase sólida, se añade una solución de prueba que contiene antígeno, y luego un segundo anticuerpo marcado con enzima. Esta prueba requiere por lo menos que dos sitios combinantes estén presentes sobre el antígeno. Luego se añade el sustrato y se relaciona la actividad enzimática.

Las enzimas que han sido empleadas con frecuencia incluyen: a la peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, lisozima y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fudenberg et al., 1982).

2.11.4. INMUNOTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA

Esta técnica se ha desarrollado para vencer algunos de los problemas encontrados en procesos de análisis de geles, como es, la fragilidad de los mismos para su manipulación y la gran cantidad de anticuerpos se requeriría para realizar las técnicas inmunológicas. Generalmente la muestra completa de proteínas es eluida de los geles e inmovilizada entre un sustrato (filtro) el cual podrá ser utilizado para la identificación de "bandas" por medio de anticuerpos. La transferencia a filtros tiene las siguientes ventajas: 1) los filtros húmedos son flexibles y fáciles de manejar, 2) las proteínas inmovilizadas son igualmente accesibles para varios ligandos, 3) el tiempo de proceso puede ser significativamente reducido, 4) se pueden hacer múltiples réplicas de un gel; es decir, un solo gel da acceso para más de una réplica, cada uno de los cuales puede ser analizado individualmente; 5) las muestras transferidas pueden ser almacenadas por meses previo a su uso; y 6) la transferencia de algunas proteínas puede ser usada para múltiples y sucesivos análisis. Además la transferencia de muestras de proteína es fácil de analizar lo cual puede ser de otro modo muy difícil o imposible para hacer sobre geles.

La mayoría de las transferencias de proteínas son usadas para la inmunodetección de antígenos específicos.

En general la transferencia de una macromolécula de geles a una matriz de inmovilización puede ser vista como dos operaciones secuenciales: 1) La elución de los polipeptidos del gel y 2) la adsorción del material eluido a una matriz inmovilizadora.

El procedimiento más ampliamente usado para la transferencia de proteínas está basado en la electroelución de las proteínas del gel al papel de nitrocelulosa. Esto es posible por el hecho de que las proteínas adsorbidas en nitrocelulosa se lleva a cabo en amortiguador de baja fuerza iónica. Por lo tanto, uno puede electroeluir las proteínas fuera del gel hacia adentro del filtro

de nitrocelulosa bajo condiciones que no requieren practicamente alta corriente electrica.

En esencia, un filtro es colocado sobre un gel asegurando que no haya burbujas de aire atrapadas entre el gel y el filtro. Las burbujas de aire crean puntos de alta resistencia resultando áreas de baja eficiencia de transferencia y bandas distorsionadas. El filtro y el gel son entonces prensados entre almohadillas porosas. El ensamble es sumergido en un tanque conteniendo "amortiguador de transferencia" y colocado entre los dos electrodos. Los electrodos están diseñados también para generar una corriente homogénea sobre el area total del gel. (Figura 2.12).

La interacción de las proteínas con el papel de nitrocelulosa no ha sido claramente entendido pero definitivamente no es sencillo. (Gershoni y Palade, 1983).

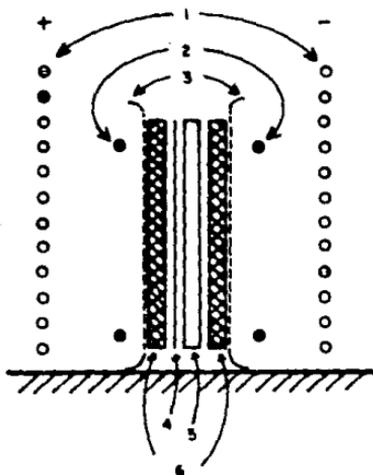


FIG. 2.12

ENSAMBLE PARA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.
1 ELECTRODO; 2 BANDAS ELASTICAS; 3 REJILLA; 4 HOJA DE NITROCELULOSA;
5 GEL DE POLIACRILAMIDA; 6 SCOTCH BRITE. LAS PARTES ENSAMBLADAS
SOLO MUESTRAN LA SEPARACION PARA VISUALIZARLAS
(TURBIN HARRY ET AL, 1979)

I I I H I P O T E S I S

Si los embriones somáticos presentan paralelismo con los embriones cigóticos entonces, estos deberán ser morfológica, fisiológica y bioquímicamente similares.

Si son morfológicamente similares deberán presentar semejanzas anatómicas y ultraestructurales por microscopía óptica y electrónica.

Si son fisiológicamente similares deberán realizar funciones similares, como por ejemplo, almacenar proteínas específicas en los cotiledones.

Si son bioquímicamente iguales, deberán entre otras características sintetizar proteínas de reserva en los mismos niveles como lo hace la semilla

I V O B J E T I V O S

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar y analizar el grado de paralelismo entre el desarrollo de embriones somáticos y cigóticos a niveles morfológico, fisiológico y bioquímico.

Morfológico por microscopía óptica

Bioquímico mediante marcadores bioquímicos

Integrando los dos aspectos anteriores con estudios ultraestructurales tratar de derivar algunos aspectos de tipo fisiológico.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES Y METAS

- 4.2.1. Extraer y caracterizar las proteínas de reserva 7S y 11S a partir de semillas de alfalfa
 - A) Identificar su patrón de bandeo en geles de poliacrilamida.
- 4.2.2. Obtener y caracterizar anticuerpos contra las proteínas de reserva de semilla.
 - A) Obtener anticuerpos policlonales contra las proteínas de reserva siguiendo diferentes esquemas de inmunización en conejo.
 - B) Caracterizar los anticuerpos producidos en los diferentes esquemas mediante:
 - a) Inmunodifusión doble
 - b) Punto de equivalencia
 - c) Inmunolectroforesis
 - d) ELISA
- 4.2.3. Hacer estudios para probar la especificidad de tejido y de estado de desarrollo mediante:
 - a) Inmunodifusión doble
 - b) Patrones de bandeo
 - c) Inmunodetección en papel de nitrocelulosa.
- 4.2.4. Hacer una comparación de los niveles de expresión de proteínas de reserva entre embriones somáticos y cigóticos, en estados homólogos de desarrollo a nivel de:
 - A) Inmunodifusión doble
 - B) Patrones de bandeo a diferentes periodos de desarrollo
 - C) Inmunodetección en papel de nitrocelulosa.
- 4.2.5. Hacer un estudio comparativo a través de microscopía óptica de la morfología de embriones somáticos y cigóticos.
- 4.2.6. Comparar las características ultraestructurales de los embriones cigóticos y somáticos, tanto en eje embrionario como en cotiledón.

V MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con semillas y plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) variedad Reagenlander línea A 70.34 proporcionada por el Dr. Daniel C.W. Brown, del Plant Research Center of Agriculture de la Universidad de Carleton, Ottawa, Canadá y semillas y plantas de la variedad Puebla 76 proporcionada por el M. en C. Luis Castro Acero de la INIFAP, Campo Agrícola Experimental "El horno" en la Universidad Autónoma de Chapingo.

Las soluciones utilizadas en las diferentes metodologías están indicadas en los apéndices correspondientes .

Para la preparación de estas soluciones y los medios de cultivo se utilizaron reactivos de las marcas: "Merck", "Sigma Chemical Corp" y "J.T. Baker" todas de grado analítico.

5.2. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA

5.2.1. PREPARACION DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los medios basales utilizados en el presente trabajo fueron Bs (Gamborg et al., 1968 modificado por Villegas y Brown, 1987) y MS (Murashige, T. y Skoog, F. 1962) al 50% (Apéndice A).

El pH se ajustó previo a la esterilización con NaOH o HCl 1.0 N. El medio de cultivo, así como el agua destilada y el material de cristalería, fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 Kg/cm² de presión durante 20 minutos.

La incubación de los cultivos se llevó a cabo en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas obscuridad a 27°C ± 3°C de temperatura.

El material biológico se manipuló bajo un ambiente estéril proporcionado por una cámara de flujo laminar de aire filtrado marca Veco unidad GHFL-A12 y se trabajó con material esterilizado y/o flameado en alcohol.

Se utilizaron peciolas de alfalfa A 70.34 como fuente de inoculo. Los brotes de alfalfa fueron cortados y desinfectados de la siguiente manera: se enjuagó en chorro de agua y se colocó en etanol al 70% durante 30-35 segundos y en seguida se pasó a hipoclorito de sodio al 30 % (0.6 de cloro activo) durante 10 minutos, con agitación suave y constante, posteriormente para eliminar los agentes desinfectantes se lavaron varias veces con agua destilada estéril.

Una vez llevada a cabo la desinfección se colocaron de 5 a 7 fracciones de peciolas de 5-8 mm. en frascos de vidrio conteniendo de 7-8 ml. de medio de cultivo.

Para la proliferación de callo y la inducción de embriones somáticos se utilizó el medio basal Bs. (Apéndice A) suplementado con 1 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de cinetina, 30 g/l de sacarosa, 9 g/l de Bacto agar y a pH 5.5 durante un tiempo de 18 días lo que incluye la etapa de inducción.

A los 18 días el callo fue transferido al medio Bs sin reguladores (medio de desarrollo) suplementado con 1.75 mg/l de casaminoácidos, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de Bacto agar, manteniéndose en este medio hasta el día 42 lo que incluye la etapa de desarrollo.

Los embriones somáticos de 42 días desde la siembra del inoculo, en estado torpedo, se transfirieron para su "germinación" (conversión) a frascos de vidrio con 20 ml. de medio MS al 50% sin reguladores de crecimiento y suplementado con 15 g/l de sacarosa, 8 g/l de Bacto agar y se ajustó el pH a 5.8.

5.3. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE RESERVA

Para poder comparar el grado de paralelismo que existe entre

los embriones somáticos y cigóticos se consideró a las proteínas de reserva como excelentes marcadores bioquímicos de la embriogénesis las cuales se analizaron como se describe a continuación:

5.3.1. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DE EMBRIONES SOMATICOS, CIGOTICOS Y LOS DIFERENTES TEJIDOS QUE CONFORMAN LA PLANTA.

A) EMBRIONES CIGOTICOS

El análisis de las proteínas de reserva de los embriones cigóticos se hizo mediante una cinética de producción de tales proteínas a diferentes periodos de tiempo para poder conocer aproximadamente en que momento comienza la síntesis y cuales son sus niveles de producción y poder utilizarlo como patrón de referencia para la embriogénesis somática.

Como primer paso se marcaron plantas de alfalfa de la variedad Puebla 76 en el terreno de cultivo. Este se dividió en 4 cuadrantes con el objeto de abarcar la mayor parte del área.

Se utilizaron 32 estacas señaladas por diferentes colores: blancas, naranja, amarillas y azules (8 estacas de cada color) y se distribuyeron al azar de tal modo que quedaran 2 estacas de cada color en cada cuadrante.

Una vez colocadas las estacas se procedió a marcar de 5-8 plantas en un punto cercano a la estaca, de las cuales se remarcaron de 15 a 20 inflorescencias con hilo del mismo color que el de la estaca, cuidando que las flores estuvieran en anthesis.

Las colectas de las vainas se hicieron a los 15, 30, 45 y 60 días post anthesis dando un margen de dos días para que ocurriera la polinización, seleccionando en cada ocasión las marcas de un solo color.

En las dos primeras colectas las vainas fueron transportadas en papel aluminio y sumergidas en hielo hasta llevar a cabo la extracción, en las dos últimas, esto ya no fué necesario debido a que las semillas ya se encontraban secas.

Para la extracción de la proteína, los embriones fueron disectados de la vaina con la ayuda de una aguja de disección y colocados en agua destilada y en frío hasta realizarse la extracción sin dejar pasar mucho tiempo.

B) EMBRIONES SOMATICOS

En los embriones somáticos el análisis de la proteína de reserva también se realizó a través una cinética de producción para conocer si estas proteínas corresponden al mismo tipo que las producidas por los embriones cigóticos y si existe alguna correlación en cuanto al tiempo de síntesis.

Cabe mencionar que esta cinética fue realizada por Cibrian A.M. (1991) como parte experimental de tesis de licenciatura y parte de este material fue proporcionado para realizar el estudio comparativo.

La cinética consistió en sembrar los inóculos (pedicelos de alfalfa) en el medio de inducción B5 suplementado con 1 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de cinetina, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de Bacto agar. Posterior al día 18 el callo se pasó al medio de desarrollo con 1.75 mg/l de casaminoácidos, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de Bacto agar manteniéndose en este medio hasta el día 42 que es el momento en que se pasan al medio de conversión.

A partir del momento en que se "sembraron" los inóculos, los embriones somáticos fueron "cosechados" cada 3 días hasta llegar al día 42 que es el momento en que los embriones empiezan a "germinar" y se procedió a realizar las extracciones de proteína.

Durante las "cosechas" hubo cierta dificultad para distinguir las diferentes etapas de los embriones por lo que se trabajó con gradientes de sacarosa con la finalidad de separar poblaciones homogéneas de embriones.

El gradiente consistió en colocar soluciones de sacarosa al 90, 70, 50 y 30% en tubos de centrifuga y agregar el callo, o callo

con embriones ya disgregado y centrifugar a 4000 r.p.m. por 20 minutos a 10°C.

Una vez centrifugado se separaron las diferentes fracciones, se eliminó el exceso de agua, se pesaron y se realizó la extracción.

C) TEJIDOS QUE CONFORMAN LA PLANTA

Con la finalidad de poder comprobar que las proteínas son tejido y estado específicas, es decir, que únicamente se encuentran durante la fase de embriogénesis, se procedió a analizar el tipo de proteínas que se encuentran en los diferentes tejidos que conforman la planta de la siguiente manera:

Se utilizó una planta completa de alfalfa, la cual se seccionó en sus diferentes tejidos: hoja, peciolo, tallo, raíz y flor. En caso de la flor ésta se consideró como tres tejidos: pétalos, columna estaminal y flor completa.

Una vez separados los tejidos, se lavaron a chorro de agua se sumergieron durante algunos minutos en alcohol, se pesaron y se realizó la extracción.

5.3.2. EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA

La extracción de proteínas se llevó a cabo aprovechando las características de solubilidad de los diferentes tipos de proteínas. Las albúminas fueron extraídas con amortiguador de fosfatos simple y las globulinas se extrajeron con amortiguador de fosfatos salino.

La extracción de las proteínas se realizó mediante el siguiente esquema:

Pesar semillas, embriones somáticos
o tejido de alfalfa

Extraer con un volumen de 10 veces
el peso del tejido con amortiguador
de fosfatos simple en mortero frio.

Centrifugar a 3500 r.p.m. (1500 X g)
durante 30 min.

El sobrenadante con la frac-
ción de albúminas guardar en
congelación.

Resuspender el botón con
amortiguador de fosfatos
salino.

Centrifugar a 3500 r.p.m.
(1500 X g) durante 30 min.

Guardar el botón en congela-
ción para que en caso neces-
ario hacer extracción de la
fracción prolaminas y gluteinas.

El sobrenadante con la
fracción de globulinas se
pone a dializar contra
amortiguador de acetatos
por 24 horas en agitación
constante.

Centrifugar a 3500 r.p.m.
(1500 X g) durante 30 min.

El botón formado principal-
mente por la proteína 11S se
resuspende en amortiguador
de fosfatos salino.

El sobrenadante se dializa
contra agua desionizada
durante 12 horas en frio.

Centrifugar a 3500 r.p.m.
(1500 X g) durante 30 min.

El botón formado principal-
mente por la proteína 7S se
resuspende en amortiguador de
fosfatos salino y se conserva
a -20°C.

Guardar sobrenadante

Centrifuga Sorvall RC-5B Du Pont Instrument, Rotor SS-34

Todo el diagrama de extracción se realizó en baño de hielo y en las soluciones se utilizaron inhibidores de proteasas (PMSF 200 μ m y EDTA 10 μ m).

Consultar el apéndice B para la preparación de las soluciones de extracción.

5.3.3. CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO BRADFORD

Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976), el cual se prepara disolviendo 0.1 gr. de azul de Coomassie G 250 en 50 ml. de etanol al 95%. Se agregan 100 ml. de H_2PO_4 al 85% y se afora con agua destilada a 1 litro. se filtra y se guarda en obscuridad.

Para la cuantificación de proteína se elaboró una curva tipo (por triplicado) de la siguiente manera:

Concentración de BSA

en μ g. partiendo de una
solución concentrada de

1 mg/ml.....	0	20	40	60	80	100
μ l de agua desionizada.....	100	80	60	40	20	0

Los extractos de las diferentes fracciones de proteína se diluyeron desde una dilución 1:1 hasta una dilución 1:100 según se considerara necesario.

A cada muestra se le añadió 5 ml. del reactivo de Bradford, se agitó en un vortex y se leyó absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 595 nm.

5.3.4. CARACTERIZACION DE LOS PATRONES DE BANDEO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA MEDIANTE GELES DE POLIACRILAMIDA

Se utilizó un equipo de electroforesis vertical Haefer Scientific Instruments, Mod. SE 200 con capacidad para un gel de 8.3 X 7 cm y de 1.50 mm. de espesor.

A) PREPARACION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Las soluciones empleadas se indican en el apéndice C.

Se utilizó un gel de corrida al 12% que se preparó mezclando 1.875 ml. de Tris 3M pH 6.8, 6 ml. de acrilamida-bisacrilamida 30/0.8/100, p/p/v, 0.150 ml. de SDS al 10% y 6.9 de agua destilada. Se utilizaron 75 μ l de PSA al 10% y 7.5 μ l de TEMED como catalizadores para polimerizar la acrilamida-bis, dandonos un total de 15 ml de solución, suficiente para 2 geles pequeños.

Inmediatamente después de preparado el gel se colocó entre las dos placas de vidrio (previamente ensambladas en el equipo de electroforesis), por medio de una pipeta graduada, dejando espacio suficiente para agregar el gel concentrador. Para favorecer la polimerización y además obtener una superficie homogénea del gel se agregaron unos microlitros de agua.

Una vez polimerizado el gel de corrida se eliminó el exceso de agua y se agregó el gel concentrador al 5% que se preparó mezclando 0.625 ml de Tris 1M pH 6.8, 0.835 ml. de acrilamida-bisacrilamida 30/0.8/100 p/p/v, 50 μ l de SDS al 10% y 3.45 ml. de agua destilada, para polimerizar se utilizaron 40 μ l de PSA al 10% y 4 μ l de TEMED. En seguida de agregar el gel concentrador se colocó el peine con el número de dientes requerido (1-20). Se dejó polimerizar durante 15 min., se retiró cuidadosamente el peine y se llenó la cámara con 250 ml. de solución amortiguador de corrida (Apéndice C)

B) PREPARACION Y DESNATURALIZACION DE LAS MUESTRAS

Una vez cuantificada la cantidad de proteína de cada extracto se tomó la alícuota necesaria para tener una concentración de 420 μ g de proteína, se agregaron 100 μ l de amortiguador de muestra

1X (Apéndice C) conteniendo β -mercaptoetanol y se llevó a 350 μ l con agua destilada, quedando una concentración de 420 μ g/350 μ l de proteína.

Las muestras fueron agitadas en vórtex y puestas en baño en ebullición durante 2 minutos.

Se aplicaron 30 μ l de cada una de las muestras ya preparadas en cada carril por medio de una micropipeta Gilson de 100 μ l.

En cada gel se utilizó un carril para colocar los marcadores de peso molecular.

Como marcadores de peso molecular se preparó una solución estandar de proteínas (BIO-RAD), tomando 10 μ l de estas proteínas y agregando 190 μ l de amortiguador de muestra 4X, de la misma forma se agitaron y se hirvieron en baño María. El peso molecular de las proteínas usadas como marcadores fue el siguiente:

Fosforilasa B	92,500 KD
Albumina de suero bovino	66,200
Ovoalbumina	45,000 "
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisosima	14,400

C) TENIDO Y DESTENIDO DE GELES

El gel fue sumergido en una solución de fijador y colorante durante 15-18 horas y destefidos con varios cambios de solución destefidora (Apéndice C) hasta eliminar el fondo azul y observar bandas polipeptídicas nítidas.

5.4. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LAS PROTEÍNAS DE RESERVA SIGUIENDO DIFERENTES ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN

El uso de anticuerpos en este estudio, representó una importante ventaja al permitir identificar antígenos de interés (proteínas de reserva) tanto en embriones somáticos como en cigóticos y de esta manera poder comparar que tan paralelos son ambos sistemas, puesto que si obtenemos anticuerpos contra las proteínas de reserva 7S y 11S de semilla y estos anticuerpos reaccionan contra las proteínas producidas por los embriones somáticos esto nos indicará entonces, que es el mismo tipo de

proteínas.

5.4.1. INMUNIZACION DE CONEJOS

Se inmunizaron conejos "Nueva Zeland" de aproximadamente 3 kg. contra proteínas de reserva 7S, 11S y globulinas obtenidas a partir de semilla de alfalfa A 70.34. Para ello se utilizó una jeringa insulínica de 1 ml. con aguja calibre 20 de 30 mm. de largo, inyectando diferentes concentraciones de proteína, (de acuerdo al esquema de inmunización), perfectamente bien emulsificada por agitación en vórtex durante 5 minutos.

5.4.2. ESQUEMAS DE INMUNIZACION

Se siguieron tres diferentes esquemas de inmunización: con la finalidad de saber cual de estos es el más conveniente para obtener una mejor respuesta de especificidad y un título más alto.

Las inmunizaciones y sangrado se realizaron de acuerdo a cada esquema.

PRIMER ESQUEMA

Para este esquema fueron inmunizados 6 conejos proporcionados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., de los cuales tres se inyectaron contra proteína 7S (una en condición nativa y dos en condiciones desnaturalizadas) y tres contra proteína 11S (una nativa y dos desnaturalizadas).

INYECCION	DIA	DOSIS	VIA
1	0	5 mg. de Ag/1ml de solución salina 0.1 M. con 1 ml. de A.C.F.	Intradérmica
2	15	5 mg. de Ag/1ml de solución salina con 1 ml. de A.I.F.	Intradérmica
3	30	0.250 mg de Ag/1ml de solución salina con 1 ml de A.I.F.	Intradérmica
4	31	0.500 mg de Ag/1ml de solución salina con 1 ml. de A.I.F.	Intradérmica
5	32	1mg de Ag/1ml de solución salina con 1ml. de A.I.F.	Intradérmica
Sangrar	39		

SEGUNDO ESQUEMA

Se inmunizaron dos conejos proporcionados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. de los cuales uno se inyectó con proteína 7S desnaturizada y otro con proteína 11S también desnaturizada.

INYECCION	DIA	DOSIS	VIA
1	0	1 mg de Ag/0.5 ml de PBS con 1 ml de A.C.F.	Intramuscular
2	30	0.5 mg de Ag con 1ml de A.I.F.	Intramuscular
sangrar	42	.	.

(Figura 5.1)

TERCER ESQUEMA

Se inmunizaron 4 conejos proporcionados por el bioterio del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del I.P.N. los cuales se inyectaron: 1 contra proteína 7S desnaturizada, 1 contra proteína 11S desnaturizada y 2 contra la fracción de globulina en condiciones desnaturizadas.

INYECCION	DIA	DOSIS	VIA
1	0	200 µg de Ag en 200 µl de A.C.F.	Subcutanea
2	15	200 µg de Ag en 200 µl de A.I.F.	Subcutanea
3	45	200 µg de Ag en 200 µl de A.I.F.	Subcutanea
4	60	200 µg de Ag en 200 µl de A.I.F.	Subcutanea
5	65	Sangrar	
6*	(95)	Reinmunización con A.I.F.	
7**	(110)	Sangrados posteriores.	

(Figura 5.1)

* Si el título es bajo reinmunizar 29 días después del sangrado con dosis iguales. 5 días después volver a sangrar.

** Si el título es alto sangrar cada 20 días por lo menos 5 veces.

1ª ESQUEMA

LAS INYECCIONES VIA INTRADERMICA SE APLICARON EN LA REGION DORSAL, RASURANDO
PREVIAMENTE AL CONEJO PARA HACER MAS FACIL LA INMUNIZACION



2ª ESQUEMA

INYECCIONES VIA INTRAMUSCULAR EN VARIOS SITIOS
DE LA REGION DORSAL



3ª ESQUEMA

INYECCIONES POR VIA SUBCUTANEA EN LA REGION ESCAPULAR
DE LOS CONEJOS



FIG. 5.1

VIA DE ADMINISTRACION DE ACUERDO A CADA ESQUEMA SEGUIDO

5.4.3. SANGRADO DE CONEJOS Y OBTENCION DE LOS ANTISUEROS

El sangrado se hizo por medio de una pequeña incisión en la vena marginal de la oreja y se aplicó vacío a través de un matraz Erlenmeyer modificado, en cuyo extremo se colocó un tubo cónico de 50 ml. (Figura 5.2)

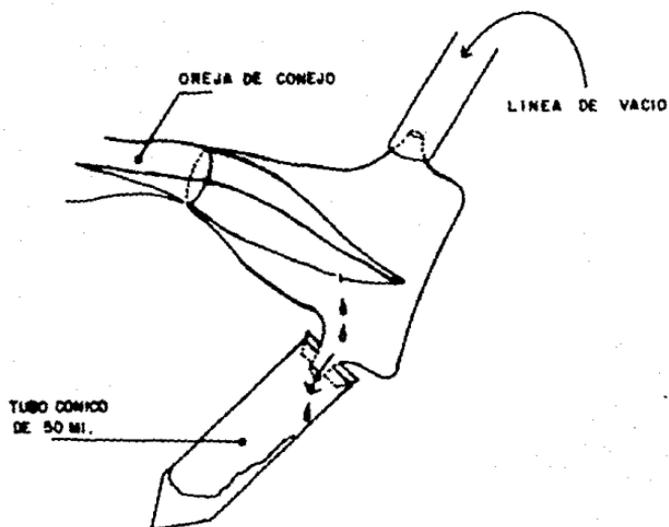


FIG. 5.2

SANGRADO DE CONEJOS POR VACIO

Se obtuvieron 25 ml. de sangre de cada conejo, que se dejó coagular y retraer en el mismo tubo durante toda la noche a 4°C; cuando los coágulos estuvieron retraídos, se desprendieron de las paredes de los tubos con una varilla de vidrio delgada y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 15 minutos. Se retiraron cuidadosamente con una pipeta Pasteur los antisueros sobrenadantes y se almacenaron a -20°C en viales de vidrio con tapón de rosca debidamente etiquetados y sellados con parafilm.

Para poder utilizar estos sueros se pasaron a refrigeración para que se descongelaran lentamente.

5.5 CARACTERIZACION DE LOS ANTISUEROS

Fue necesario caracterizar los antisueros producidos en los tres esquemas de inmunización para poder conocer que tan específicos eran estos hacia los antígenos para los cuales se obtuvieron, que en este caso correspondieron a las proteínas de reserva 7S y 11S, y poder así utilizarlos en pruebas posteriores, utilizando únicamente aquellos que alcanzaron un mejor título y especificidad.

La caracterización de los anticuerpos se realizó mediante las técnicas de :

- A) Inmunodifusión doble
- B) Punto de equivalencia
- C) Inmunolectroforesis
- D) ELISA

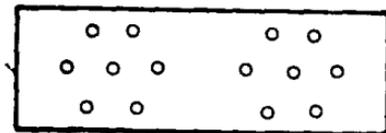
5.5.1. INMUNODIFUSION DOBLE

A) PREPARACION DE PLACAS

Se preparó una solución de agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6, diluyendo en caliente sin dejar de ebulir en baño María, hasta obtener una solución cristalina.

Se vació rápidamente sobre portaobjetos limpios, en caliente evitando gelificar 2.8 ml de la solución de agarosa. Posteriormente se dejaron gelificar y se mantuvieron en una cámara húmeda cerrada a 4°C.

Se hicieron perforaciones en estas placas de agarosa con un sacabocado (como se muestra en la siguiente figura) y se removieron mediante vacío.



Los pozos así formados se llenaron con el suero en el centro y los antígenos (proteína nativa o desnaturalizada) alrededor o viceversa.

Los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda, la cual se montó usando una caja Petri cuya tapa se cubre con un disco de papel húmedo.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas y se buscaron bandas de precipitación.

B) LAVADO DE PLACAS

Después de la incubación de las placas a temperatura ambiente. Se colocaron sobre dos toallas de papel y se comprimieron con un objeto de aproximadamente 1 kg por 15 minutos. Se sumergieron en solución salina 0.1 M por 12 horas y 12 horas más por inmersión en agua bidestilada.

Por último, se comprimieron nuevamente y se secaron durante 10 minutos en horno eléctrico.

C) TINCIÓN DE PLACAS

Las placas se sumergieron en una solución de tinte preparado con azul de Coomassie R (Apéndice C) durante 15 minutos. Se enjuagaron con agua para eliminar el exceso de colorante y se sumergieron en una solución destefidora (Apéndice C) durante el tiempo necesario para eliminar el fondo azul.

La preparación, lavado y tinción de las placas de agarosa fue

similar para las técnicas de inmunodifusión doble, punto de equivalencia e inmunolectroforesis.

5.5.2. PUNTO DE EQUIVALENCIA

Esta técnica es utilizada para conocer el título o concentración aproximada del antígeno o el anticuerpo.

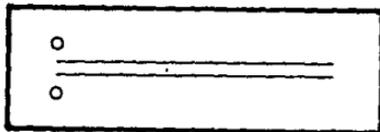
Se hicieron diluciones seriadas de la proteína nativa o desnaturalizada desde 1:1 hasta 1:64 partiendo de una solución madre de 1mg/ml, usando como amortiguador Tris o fosfatos pH 8.6.

Se colocaron 10 μ l de cada dilución en cada uno de los 6 pozos del gel de agarosa y se colocó el antisuero en el centro.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas y se buscaron bandas de precipitación.

5.5.3. INMUNOELECTROFORESIS

A las placas de agarosa previamente preparadas se les hicieron dos pozos de 3 mm de diámetro en la parte central y se marcó un carril entre los dos pozos con navaja para rasurar como se muestra en la siguiente figura.



En los pozos se colocó el antígeno: 10 μ l de antígeno + 1 μ l de azul de bromofenol al 1%, pH 8.6.

Los portaobjetos fueron colocados sobre la placa del soporte de electroforesis perfectamente paralelo entre sí y perpendiculares a los depósitos de amortiguador de la cámara de electroforesis (2117 Multiphor II) los cuales habían sido llenados previamente con amortiguador de corrida. Las placas de agarosa se conectaron a los depósitos con papel filtro humedecido con el mismo amortiguador (Figura 5.3).

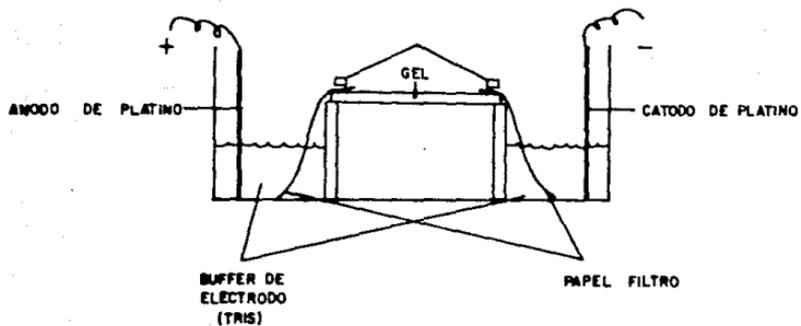


FIG. 5.3

CAMARA DE ELECTROFORESIS APROPIADA PARA LA TECNICA DE INMUNOELECTROFORESIS (MULTIPHOR II). (JOHNSTONE ALAN 1987).

Para la corrida se utilizó una fuente de poder llevándola a 60 volts por 10 minutos y posteriormente a 120 volts por 60 minutos.

Al terminar la corrida se removió el agar del carril que se encuentra entre los dos pozos donde se colocaron 100 μ l de antisuero

Se incubaron a temperatura ambiente de 24 a 48 horas y se buscaron bandas de precipitación.

DESNATURALIZACION DE LAS PROTEINAS 7S Y 11S PARA LA CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS

Se tomó el volumen de proteína necesaria para tener una concentración de 1 mg/ml, se añadieron 50 μ l de β -mercaptoetanol y se llevó a 1 ml con Tris 15 mM pH 8.6. Se hirvieron en baño María durante 5 minutos, se sacaron, se agitaron y se dejaron hervir dos minutos más.

La proteína se retiró del tubo Eppendorf y se colocó en bolsas de diálisis previamente tratadas con EDTA, se cerraron perfectamente y se dejaron durante toda la noche en Tris pH 8.6 en agitación.

5.5.4. ELISA

Se considera una de la técnicas inmunológicas más sensibles.

Esta técnica se realizó mediante los siguientes pasos:

- 1.- Cubrir con Ag (100 μ l/pozo) 5 μ g diluido en PBS.
- 2.- Incubar 1 hora a 37°C o durante toda la noche a 4°C.
- 3.- Eliminar el Ag sin lavar, golpeando suavemente las placas en papel higiénico.
- 4.- Adicionar 150 μ l de solución bloqueadora (Apéndice D) para eliminar las uniones inespecíficas.
- 5.- Incubar por una hora a 37°C.
- 6.- Eliminar el exceso de bloqueador igual que en el paso 3. Lavar tres veces con PBS-T. El primer lavado debe ser rápido con piceta cubriendo totalmente los pozos, en el segundo y tercer lavado dejar en PBS-T durante 5 minutos e inmediatamente eliminar y secar.
- 7.- Preparar en un tubo Eppendorf 250 μ l de suero diluido 1:20 y

colocar 200 μ l de esta dilución en el primer pozo de cada columna. Hacer diluciones seriadas sobre la placa con PBS-T + glicina 5%.

- 8.- Incubar por 1 hora a 37°C o toda la noche a 4°C.
- 9.- Lavar tres veces con PBS-T y adicionar 150 μ l por pozo del conjugado anti-conejo en una dilución 1:3000 con PBST-glicina.
- 10.- Incubar 1 hora a 37°C.
- 12.- Lavar tres veces con PBST y adicionar el sustrato (Capéndice D)

Los controles se indican en el siguientes esquema:

Placa 1: Forrada con Ag 1 (7S)

A	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
B						
C						
D						

- Pozos de la hilera A - Incubados en presencia de antígeno y antisuero.
- Pozos de la hilera B - Incubados en ausencia de antígeno y presencia de antisuero.
- Pozos de la hilera C - Incubados en presencia de antígeno y ausencia de antisuero.
- Pozos de la hilera D - Incubados en ausencia de antígeno y antisuero.

(En todos los casos el antisuero se utilizó en diluciones desde 1:20 hasta 1:640)

Placa 2: Forrada con Ag 2 (11S).

Los pozos que no llevan Ag se forraron con PBS-T-glicina al 5%.

5.6. PRUEBAS PARA DEMOSTRAR LA ESPECIFICIDAD DE TEJIDO Y ESTADO DE DESARROLLO POR INMUNODIFUSION DOBLE

Fue muy importante en este estudio tratar de comprobar que las proteínas de reserva son tejido y estado específicas, es decir, que no se encuentran en ningún otro tejido de la planta y se presentan únicamente durante el desarrollo del embrión para poderlas considerar como marcadores bioquímicos de la embriogénesis. Con este fin, se hicieron pruebas de especificidad de tejido con los extractos de los tejidos de la planta: hoja, peciolo, tallo, raíz y flor, y estado de desarrollo con los embriones somáticos y cigóticos producidos durante sus respectivas cinéticas. Estas pruebas se hicieron por la técnica de inmunodifusión doble, utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de reserva de semilla.

5.7. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS DEL GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS A PAPEL DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCION POR PEROXIDASA

Las soluciones utilizadas se indican en el apéndice E

La metodología que se siguió fue la siguiente:

- 1.- Una vez terminada la "corrida" del gel de poliacrilamida-SDS se colocó el gel en TBS 1X por 5-15 minutos, al mismo tiempo que se humedecieron 6 hojas de papel filtro y las fibras en amortiguador de transferencia.
- 2.- Se humedeció el PNC en agua destilada
- 3.- La formación del "sandwich" se realizó de la siguiente manera:
 - o Se Colocó el gel sobre tres hojas de papel filtro (humedecidas), asegurándose que no hubiera burbujas atrapadas entre el gel y el papel.
 - o Se colocó la unidad papel-gel sobre la fibra previamente humedecida.
 - o Sobre el gel se colocó el PNC, evitando el atrapamiento de burbujas.
 - o Para completar el "sandwich" se adosaron las otras tres hojas de papel filtro y en seguida la otra fibra, sobreponiendo en las partes laterales el soporte de plástico.

- 4.- Se Colocó el "sandwich" en la cámara llena de amortiguador de transferencia asegurándose que el gel estuviera orientado hacia el cátodo (-) y el PNC hacia el ánodo (+).
- 5.- Se transfirió a 250 miliampers durante 3 horas ó a 100 miliampers durante toda la noche.
- 6.- Terminando el tiempo de transferencia, se tiró el gel con azul de Coomassie para verificar que la transferencia se haya realizado.
- 7.- Se pasó el PNC con ayuda de pinzas a una charola con solución de bloqueo por 30 minutos en agitación suave y constante.
- 8.- Se lavó tres veces con TBS, cada lavado de 5 minutos cubriendo al PNC y se eliminó el exceso de TBS.
- 9.- Se agregó la solución del primer ligando Ab (suero conejo α 7S y 11S) en una dilución 1:50 en solución de amortiguador de anticuerpo. Se tapó y dejó incubar toda la noche.
- 10.-Se enjuagó el PNC con TTBS 1X dos o tres veces durante 5 minutos cada uno, agitando constantemente.
- 11.-Se agregó el segundo ligando (suero de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa), en una dilución 1:3000 con amortiguador de anticuerpo durante una hora en agitación constante.
- 12.-Se enjuagó el PNC dos veces de 5 minutos cada una con TTBS y una vez con TBS.
- 13.-Por último, se agregó el sustrato, se agitó y se observaron resultados. Una vez aparecidas las bandas enjuagó con agua.

5.8. PREPARACION DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Para el estudio ultraestructural se utilizaron embriones somáticos de 35 días de desarrollo y semillas de la variedad puebla 78.

5.8.1. TRATAMIENTO PARA EMBRIONES SOMATICOS

Los embriones seleccionados (de 15 a 20), en estado torpeda fueron fijados en glutaraldehido al 1% en amortiguador de fosfatos 0,025 mM. y pH 6.8 por una hora a temperatura ambiente, seguido

por glutaraldehído al 3% en el mismo amortiguador por 2 horas. Se lavaron tres veces en amortiguador de fosfatos y posteriormente se llevó a cabo una post-fijación con tetroxido de osmio al 1% durante toda la noche a 4°C seguida de enjuagues en amortiguador.

A continuación se llevó a cabo la deshidratación etanólica con cambios de alcohol al 60, 70, 80, y 90%, tres cambios de alcohol absoluto y finalizando con un cambio de óxido de propileno, cada cambio se realizó cada 15 minutos.

Posteriormente se llevó a cabo la infiltración en resina Spurr-Oxido de propileno en la forma como se indica a continuación:

Resina Spurr-Oxido de propileno

1:1	4-6 horas
3:1	Toda la noche
pura	4-6 horas
pura	4-6 horas

Por último las muestras se polimerizaron a 60° C por 48 horas.

Para la obtención de cortes se utilizó un ultramicrotomo (Reichert-Jung). Los cortes de 0.5 a 0.8 micrómetros se utilizaron para microscopía óptica. Para microscopía electrónica se obtuvieron cortes de 100 a 200 Å y se montaron en rejillas de 50 a 100 hoyos.

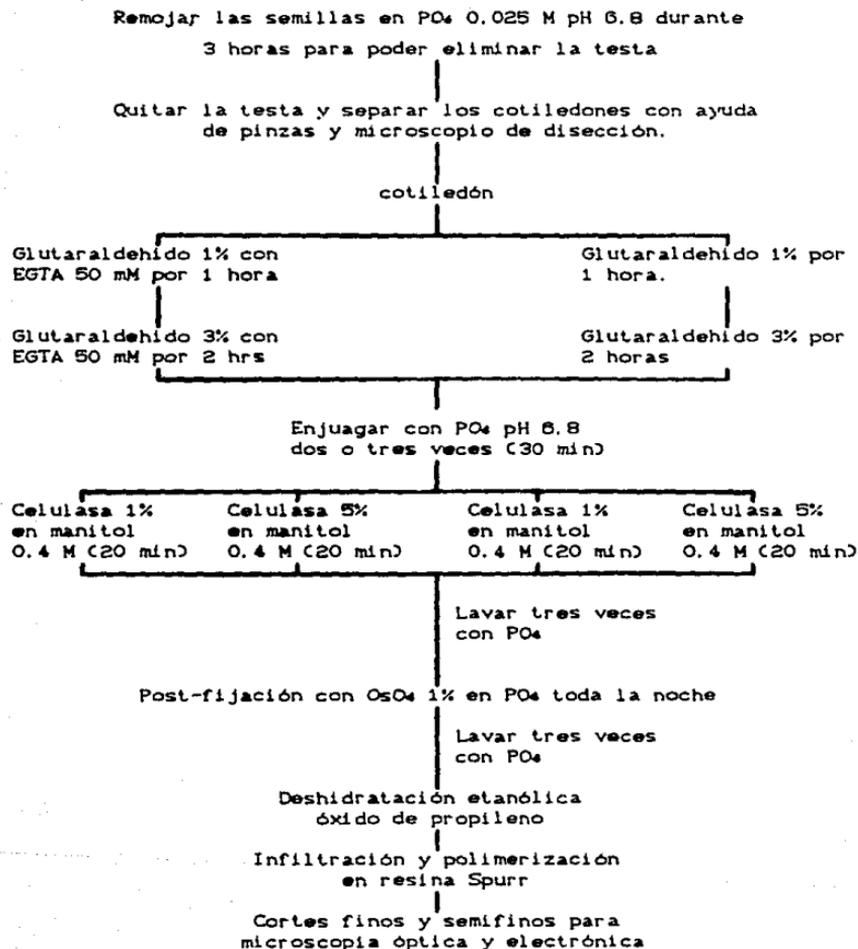
Para microscopía óptica los cortes se tñieron con azul de toluidina por 10-15 segundos.

Para microscopía electrónica de transmisión los cortes se contrastaron por 4 horas en uranilo y 3 minutos en plomo o 30 minutos en uranilo y 3 minutos en plomo.

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol 2000 EX y en Zeiss EM 9.

5.8.2. TRATAMIENTOS PARA EMBRIONES CIGOTICOS

Se trabajó con semillas de alfalfa de 60 días de desarrollo las cuales se trataron de la siguiente manera:



La celulasa se utilizó con la finalidad de hacer más permeable la pared celular y permitir la entrada de las soluciones fijadoras.

VI RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. SISTEMA DE CULTIVO DE TEJIDOS DE ALFALFA

Los embriones somáticos utilizados en este estudio fueron obtenidos de peciolo de plantas de alfalfa de la línea A 70.34, que es una clona derivada de la variedad comercial Reagenlander. Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero e in vitro, siendo mantenidas bajo condiciones favorables.

De acuerdo con el método de cultivo, los peciolo crecieron en presencia de los reguladores de crecimiento y produjeron tejido calloso a los 14 días después de la siembra, a los 18 días, tiempo en que se completaba la fase de inducción, los callos se transfirieron al mismo medio, libre de reguladores de crecimiento. En este segundo medio los embriones somáticos se desarrollan y maduran.

Aunque el proceso de embriogénesis no tiene sincronia, durante el desarrollo de los embriones se pueden observar poblaciones donde un determinado estado de desarrollo predomina sobre otros, en cultivos de 21 días se encontró una población muy grande de embriones en estado globular, a los 28 días predominó la población de torpedo muy joven, a los 35 días predominó el estado torpedo maduro y a los 42 días la mayoría de los embriones se encontraba en una fase a la que se llamó cotiledonaria y que se caracterizó por la apertura de los cotiledones y un inicio del desarrollo de la plántula, cabe mencionar que los embriones somáticos no tienen un periodo de latencia como lo tiene la semilla que se produce en forma natural, por lo tanto una vez que han completado su fase de maduración, los embriones somáticos comienzan a desarrollar sus meristemas apicales y radicales y dan origen a la planta completa, a esto se debe que algunos autores como Stuart *et al* 1985 llaman a este proceso "conversión", para diferenciarlo del proceso natural de germinación que ocurre en la semilla.

Para favorecer el desarrollo de las plantas, los embriones somáticos de 42 días fueron rescatados a un medio MS basal al 50%, donde se desarrollaron los meristemas para dar origen a las plantas de alfalfa regeneradas.

La germinación de los embriones fue del 60% a las dos semanas después del rescate. Las plántulas regeneradas se mantuvieron dentro de los recipientes "magenta" por periodos de cuatro a seis semanas para completar la germinación y dejar que las plántulas robustecieran su sistema radical lo más posible antes de ser transplantadas a macetas.

El sistema de producción de embriones somáticos es un proceso que ya estaba establecido en el laboratorio, sin embargo, durante la primera fase de la realización de esta investigación se trabajó sobre el cultivo de tejidos haciendo varias siembras con el fin de obtener embriones maduros de buena calidad dentro de los cuales se seleccionaron los que presentaban mejores características morfológicas externas para los estudios bioquímicos, inmunológicos y de microscopía electrónica. Sobre todo, para los estudios de ultraestructura durante todas las siembras realizadas, se identificaron y aislaron los embriones más representativos de cada estado particular, para hacer su fijación inmediata y posteriormente su preparación de acuerdo a la metodología descrita.

6.2. SEPARACION DE EMBRIONES SOMATICOS Y SEXUALES DE ACUERDO A SUS DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO

Como este es un estudio comparativo entre el desarrollo de los embriones somáticos y sexuales en diferentes fases de madurez, a continuación se detallan los diferentes estadios encontrados:

En el caso de los embriones somáticos, una vez que se produjeron los embriones en el medio de desarrollo, se seleccionaron los más representativos correspondientes a las siguientes fases: globular, torpedo joven, torpedo maduro y cotiledonar, con poblaciones de embriones en estos estados se

hicieron los estudios bioquímicos e inmunológicos.

Con base en las observaciones morfológicas realizadas, se logró establecer analogías entre los diferentes estados de desarrollo homólogos entre embriones somáticos y cigóticos, con el objetivo de apoyar los estudios comparativos subsecuentes. Los resultados se muestran en la tabla VI.1

Tabla VI.1

TIEMPOS DE HOMOLOGIAS ENTRE EMBRIONES CIGOTICOS Y SOMATICOS

FASES DE DESARROLLO	EMBRION CIGOTICO	EMBRION SOMATICO
Globular-corazón.	15 días P. A.	21 días
Torpedo joven	30 días P. A.	28 días
Torpedo maduro	45 días P. A.	35 días
Cotiledonar	60 días P. A.	42 días

cabe aclarar que la fase de corazón es un estado muy rápido en ambos tipos de embriones, lo que hace muy difícil el poder separar este estado en forma independiente, por lo que en general siempre se detecta con fase globular.

6.3. EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA DE SEMILLA DE ALFALFA

Después de repetidos intentos, siguiendo la metodología descrita en la sección de materiales y métodos, se separaron las proteínas de reserva 7S y 11S, las cuales fueron sometidas a ciclos repetidos de precipitación isoelectrica, centrifugación y solubilización, para asegurar su limpieza. Los patrones de bandas de las proteínas purificadas obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, se muestran en la figura 6.1

La observación de esta nos revela un patrón de bandeo muy limpio, prácticamente sin contaminación, la composición de las bandas es muy similar a lo reportado en la literatura por Stuart,

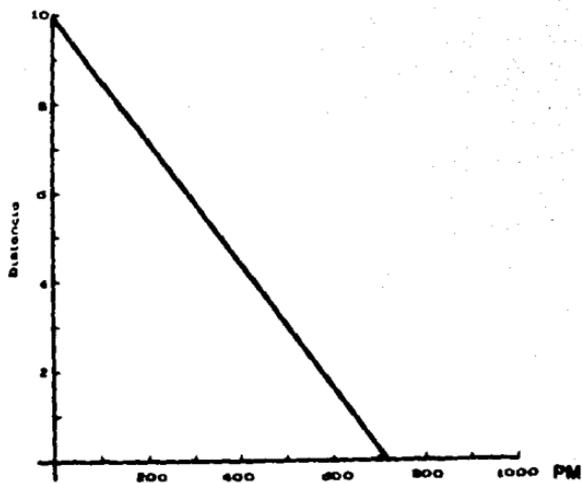
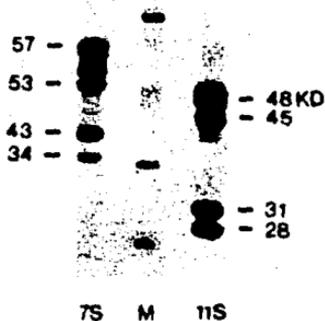
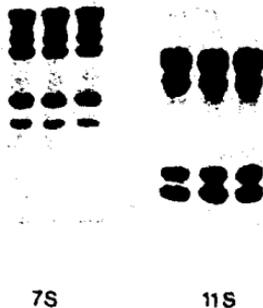


Figura 6.1

Patrón electroforético de las proteínas de reserva 7S y 11S obtenidas de semilla de alfalfa *Medicago sativa* L., donde se indican sus respectivos pesos moleculares. (Marcadores = MD).

et al 1985; Stuart y Nelsen 1988, datos ya mencionados en el capítulo de introducción.

La proteína 11S presenta dos familias de bandas, una de 28 a 31 Kilodaltones y otra de 45 a 48 KD. Stuart et al 1985 reportan para esta proteína bandas de 20, 22, 39 y 47 KD. Las familias de bandas se deben a que estas proteínas son producto de familias de multigenes (Higgins 1984; Pernollet 1985; Kronchko 1988) con ligeras diferencias en los pesos de los productos de expresión, cabe recordar que estos dos polipéptidos son sintetizados a partir de un mensajero común que es procesado post traduccionalmente (Higgins 1984; Pernollet 1985).

La proteína 7S presenta grupos de bandas entre 34 y 43 KD, entre 53 y 57 KD. Para esta proteína se reportan bandas de 32, 36, 52 y 58 KD en Stuart, et al 1985, su patrón de bandeado también es muy limpio, aunque se observa una ligera contaminación en la parte inferior del gel; la literatura reporta que esta proteína a menudo está ligeramente contaminada con una proteína de bajo peso molecular con coeficiente de sedimentación 1.5 S, que se encuentra en concentraciones muy bajas, consideramos que para los propósitos de este estudio, el grado de pureza alcanzado es bastante aceptable, ya que si se produjeran anticuerpos contra esta proteína, también resultaría interesante probar su presencia en embriones somáticos, en aras de este estudio de paralelismo bioquímico.

6.4. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES OBTENIDOS MEDIANTE DIFERENTES ESQUEMAS

Se siguieron tres diferentes esquemas de inmunización, descritos en la sección de materiales y métodos: con el esquema No. 1 se obtuvieron seis antisueros diferentes, con el esquema No. 2 se obtuvieron dos antisueros diferentes y con el esquema No. 3 se produjeron cinco antisueros. Se obtuvo un total de trece lotes de antisueros policlinales que hubo que caracterizar por inmunodifusión doble, también conocido como Ouchterlony e

inmunolectroforesis en gel de agarosa.

Los resultados de la especificidad que presentaron los diferentes antisueros al reaccionar contra las proteínas de reserva 7S y 11S, tanto en condiciones nativas, como desnaturalizadas, se muestran en las figuras 6.2-6.7

El análisis de los resultados sugiere que la ruta de inmunización y la dosis de administración del antígeno no fué un factor determinante en la obtención de anticuerpos, ya que en los tres esquemas hubo producción de ellos, sin embargo, independientemente del esquema seguido, se observa gran heterogeneidad en la respuesta de los anticuerpos hacia los diferentes antígenos, esto se debe a que los anticuerpos son de tipo policlonal y que las proteínas comparten regiones de homología, por lo tanto es muy común encontrar reacciones cruzadas. En los anticuerpos policlonales existen grupos que son específicos hacia varios epitopos. Esto hace necesario caracterizar un anticuerpo antes de poder emplearlo en estudios posteriores.

Un resumen de los resultados obtenidos durante la caracterización de todos los antisueros producidos en los diferentes esquemas probados, del antígeno inicial inyectado al conejo, el tipo de respuesta obtenida en las pruebas con proteína nativa y desnaturalizada y finalmente el tipo de especificidad encontrada después de las reacciones de inmunodifusión doble, inmunolectroforesis y ELISA se encuentra en la tabla VI.2 aunque más adelante se analiza cada suero individualmente.

En la siguiente figura, se encuentra la clave de las abreviaturas utilizadas, para facilitar el análisis de las fotografías subsiguientes:

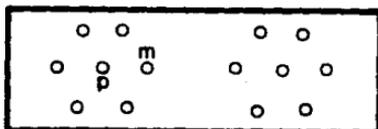
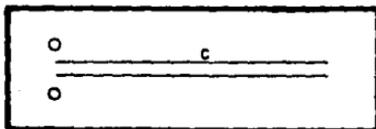


TABLA VI.2 RESPUESTA DE LOS DIFERENTES ANTISUEROS CONTRA LA PROTEINA DE RESERVA.

ESQUEMA	ANTISUERO	PROTEINA INYECTADA	PROTEINA				ESPECIFICIDAD
			NATIVA		DESNATURALIZ.		
			T _S	II _S	T _S	II _S	
1	A ₁	T _S NAT.	+++	-	-	-	T _S NAT.
	A ₂	II _S NAT.	++	++	-	+	T _S II _S NAT. II _S DES.
	A ₃	T _S DES.	++	++	++	+	T _S II _S NAT. II _S DES.
	A ₄	II _S DES.	+++	+	-	-	T _S II _S NAT.
	A ₅	T _S DES.	-	++	-	+++	II _S NAT. II _S DES.
	A ₆	II _S DES.	-	+	-	++	II _S NAT. II _S DES.
2	B ₁	T _S DES.	+	-	-	-	T _S NAT.
	B ₂	II _S DES.	+	+++	+	++	T _S II _S NAT. II _S DES.
3	C ₁	T _S DES.	+++	+			T _S II _S NAT.
	C ₂	II _S DES.	++	++			T _S II _S NAT.
	C ₃	GLOB.	++	+			T _S II _S NAT.
	C ₄	GLOB.	+++	+			T _S II _S NAT.
	C ₅	GLOB.	+	+			T _S II _S NAT.

(-) AUSENCIA DE PRECIPITADO

(+) CANTIDAD DE PRECIPITADO

A.- ANTISUEROS OBTENIDOS POR EL PRIMER ESQUEMA

B.- ANTISUEROS OBTENIDOS POR EL SEGUNDO ESQUEMA

C.- ANTISUEROS OBTENIDOS POR EL TERCER ESQUEMA

Ag - Antígeno.
Ab - Antisero.
p - pozo central.
c - carril
m - muestra

De los ensayos con los diferentes antisueros, se determinaron aquellos que mostraron mayor selectividad hacia un determinando tipo de proteína: El suero "As", mostró especificidad contra la proteína 7S nativa, tanto por inmunodifusión doble, como por inmunoelectroforesis (Fig. 6.2).

El suero "As" mostró una identidad parcial con las proteínas 7S y 11S nativas, esto sugiere que existen determinantes antigénicos compartidos por las dos (Fig. 6.3 B), sin embargo en condiciones desnaturalizadas (Fig. 6.3 D) hay reacción específica contra la 7S, esto hace pensar que el epítopo común era de carácter estereoquímico.

Resulta interesante hacer notar que, bajo la influencia de un campo eléctrico y el efecto de la desnaturalización el antisero "As" (Fig. 6.3 F) es capaz de reconocer a la proteína 11S desnaturalizada.

La reacción de los antisueros "As" y "As" contra las mismas proteínas se puede observar en las figuras 6.4 y 6.5 respectivamente, del análisis de los resultados se sugiere que en este caso la proteína 7S expone dos determinantes antigénicos, uno de ellos compartido con la 11S, los cuales son conservados después de desnaturalizar la proteína, dando una reacción cruzada. (Fig. 6.4 B y C y 6.5 B).

En el análisis de la inmunoelectroforesis, usando proteínas nativas y desnaturalizadas, se esperaba encontrar tres bandas, dos de ellas correspondiendo a la 7S y una a la 11S, sin embargo bajo la acción del campo eléctrico se modifica la exposición de sus determinantes (Fig. 6.4 D).

La proteína 7S al ser sometida a un campo eléctrico, expone sólo uno de sus determinantes antigénicos, el otro queda bloqueado



Figura B.2

Caracterización del antisuero "A1" mediante inmunodifusión doble (A y B) e inmunolectroforesis (C).

Todos los pozos (p) y carriles (c) contienen Ab "A1".

A) 1 a 6 diluciones de proteína 7S nativa; B) 1-7S nativa; 2-11S nativa; C) 1-7S nativa; d-11S nativa.

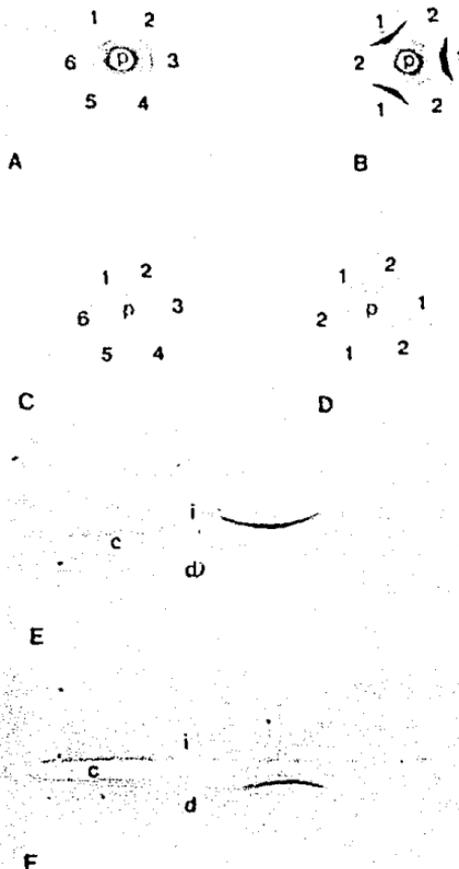


Figura 6.3

Caracterización del antisuero "Az" por inmunodifusión doble (A-D) e inmunoelectroforesis (E y F).

Todos los pozos (p) y los carriles (c) contienen Ab "Az"

A) 1 a 6 diluciones de proteína 11S nativa; B) 1-7S nativa; 2-11S nativa; C) 1 a 6 diluciones de 11S desnaturalizada; D) 1-7S desnaturalizada, 2-11S desnaturalizada; E) i-7S nativa, d-11S nativa; F) i-7S desnaturalizada, d-11S desnaturalizada.

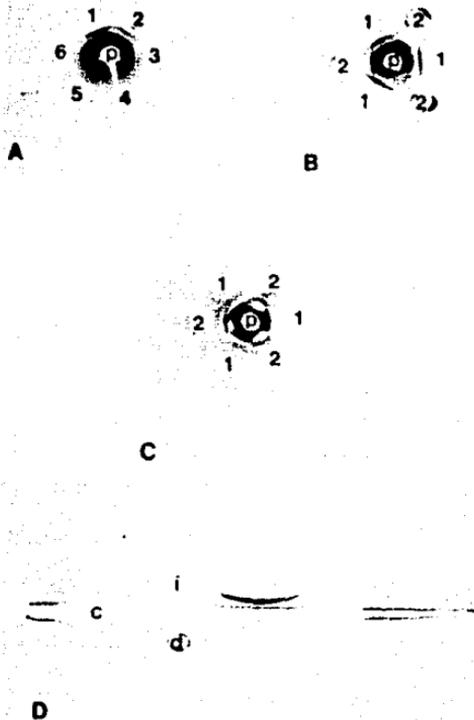


Figura 6.4

Caracterización del antisuero "As" por inmunodifusión doble (A-C)

e inmunoelectroforesis (D)

Los pozos (p) y carril (c) contienen Ab "As".

A) 1 a 6 diluciones de la proteína 7S nativa; B) 1-7S nativa;

2-11S nativa; C) 1-7S desnaturalizada; 2-11S desnaturalizada;

D) i-7S nativa; d-11S nativa.

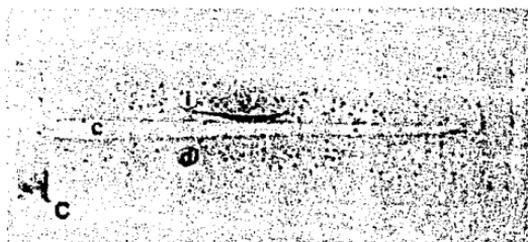


Figura 6.5

Caracterización del antisuero "A_s" por inmunodifusión doble (A y B) e inmunolectroforesis (C).

Los pozos (p) y carril (c) contienen Ab "A_s"

A) 1 a 6 diluciones de la proteína 7S nativa; B) 1-7S nativa; 2-11S nativa; C) 1-7S nativa; d-11S nativa.

y no es reconocido por el anticuerpo. Lo mismo sucede con la 11S, cuyo determinante antigénico queda bloqueado. Así sólo se observa una banda de precipitación. (Figs 6.4 D y 6.5 C).

Los sueros "As" y "Aa" (Figuras 6.6 y 6.7) aunque fueron obtenidos contra diferentes proteínas muestran un comportamiento semejante en cuanto a su especificidad, reaccionan con la proteína 11S en sus dos condiciones, discriminando a la proteína 7S, de tal manera que resulta un antisuero específico contra 11S.

El mismo tipo de análisis se realizó con los antisueros "B1" y "B2" y los resultados obtenidos se resumen en la tabla VI.2. El análisis de los antisueros obtenidos por el tercer esquema de inmunización se realizó empleando la técnica de ELISA, con el objeto de tener mayores niveles de sensibilidad, los resultados se muestran en las figuras 6.8 y 6.9. El análisis de los mismos nuevamente revela la heterogeneidad en el grado de especificidad de un grupo de anticuerpos por un determinado antígeno. Sin embargo en algunos casos fué evidente una mayor especificidad de un anticuerpo hacia un antígeno en particular, tal como es el caso de los sueros "C3" y "C4", los cuales presentaron una mayor especificidad hacia la proteína 7S con respecto a los demás antígenos.

Una vez caracterizados cada uno de los antisueros y analizando la tabla VI.2 se puede decir que aunque en la mayoría de los casos existió heterogeneidad en la respuesta de los antisueros hacia los antígenos, fué en el primer esquema donde se obtuvieron los sueros con mayor especificidad, como es el caso del suero "A1" que es específico para la proteína 7S nativa, y los sueros "As" y "Aa" que son específicos para la proteína 11S nativa o desnaturalizada. En el tercer esquema se presentó una menor especificidad hacia un antígeno en particular, pero fué en este esquema en el que hubo un mayor título con respecto a los otros esquemas, entre los cuales se pueden mencionar los sueros "C3" y "C4" que fueron los que presentaron un mayor título y especificidad.

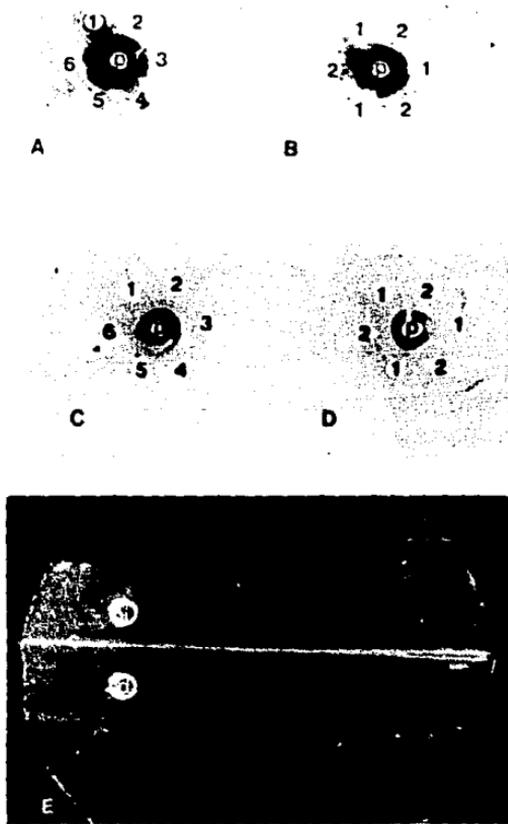


Figura 6.6

Caracterización del antisuero "As" por inmunodifusión doble (A-D) e inmunolectroforesis (E).

Todos los pozos (p) y el carril (c) contienen Ab "As"

A) 1 a 6 diluciones de proteína 11S nativa; B) 1-7S nativa,

2-11S nativa; C) 1 a 6 diluciones de proteína 11S desnaturalizada; D) 1-7S desnaturalizada, 2-11S desnaturalizada; E) 1-7S nativa, d-11S nativa.

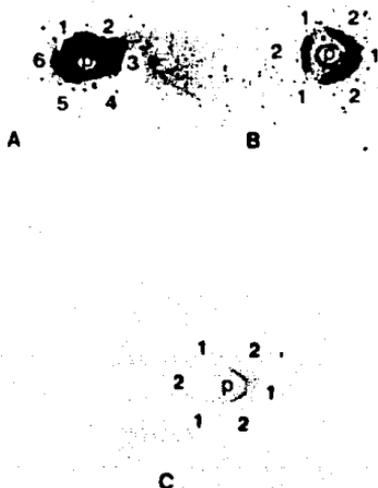


Figura 6.7

Caracterización del antisuero "As" por inmunodifusión doble (A-C).

Los pozos (p) contienen Ab "As"

A) 1 a 6 diluciones de proteína 11S nativa; B) 1-7S nativa, 2-11S nativa; C) 1-7S desnaturizada, 2-11S desnaturizada.

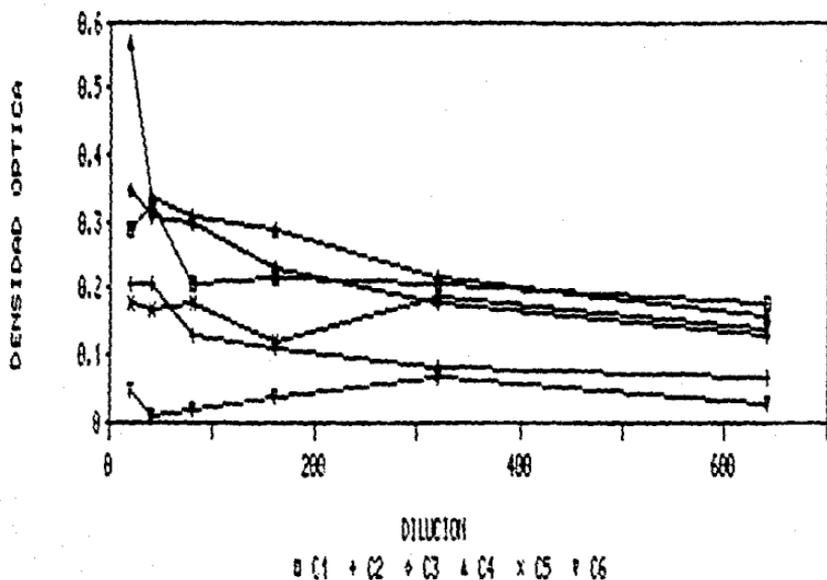


Figura 6.8

Respuesta de los antisueros obtenidos en el tercer esquema de inmunización, probados con la proteína 7S por la técnica de ELISA.

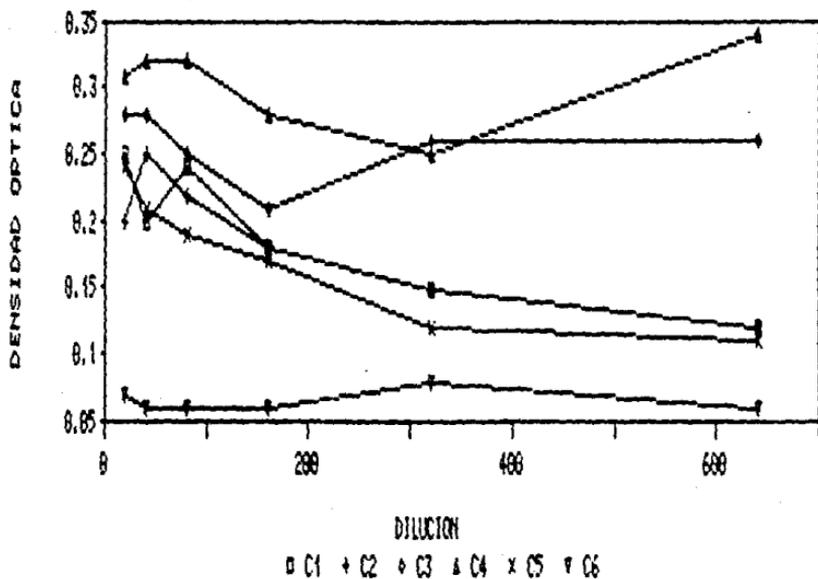


Figura 6.9

Respuesta de los antisueros obtenidos en el tercer esquema de inmunización, probados contra proteína 11S por la técnica de ELISA.

6.5. RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD DE TEJIDO EN LA SINTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA

Para poder hacer una comparación entre el grado de paralelismo que existe entre un embrión somático y uno cigótico en estados homólogos de desarrollo a niveles fisiológicos y bioquímicos, resulta necesario buscar marcadores bioquímicos de embriogénesis, esto significa: buscar ciertos compuestos que sólo sean sintetizados o producidos durante el proceso de embriogénesis y en ningún otro momento durante el ciclo de vida de la planta, es decir, estos compuestos sólo se deben encontrar en el embrión y en ningún otro tejido de la planta, además sólo pueden ser sintetizados durante la génesis del mismo.

Stuart y colaboradores 1985 también sugirieron desarrollar un criterio más bioquímico para poder conocer el grado de paralelismo que existe entre los dos sistemas y propusieron a las proteínas de reserva como excelentes marcadores bioquímicos.

Esto garantiza que, si estos compuestos que son altamente específicos del proceso de embriogénesis, son encontrados en los embriones somáticos, sería clara la evidencia de un cierto grado de paralelismo entre los dos procesos.

Los resultados de la cantidad de proteína que hay en los diferentes tejidos se muestra en la tabla VI. 3. Los resultados reportados son un promedio de tres extracciones realizadas en forma independiente de los diferentes tejidos.

En la tabla VI.4, se reportan los valores de las constantes de las curvas de calibración obtenidas para cada extracción. Las curvas se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, también se reporta el coeficiente de correlación obtenido para cada caso.

Del análisis de la tabla VI.3, se puede discutir que la semilla es el órgano de la planta que acumula mayor cantidad de proteína, cabe aclarar que los valores reportados tanto en peso seco como por peso fresco, corresponden a la cantidad de proteína soluble extraída del tejido correspondiente, en el caso particular de la semilla, la proteína se encuentra altamente empaquetada dentro de

Tabla VI.3 CANTIDAD DE PROTEINA EN LOS DIFERENTES TEJIDOS QUE CONFORMAN LA PLANTA DE ALFALFA

TIPO DE TEJIDO	mg DE PROTEINA TOTAL/ gr DE TEJIDO FRESCO	mg DE PROTEINA/ gr DE TEJIDO SECO	RELACION ALB: GLOB
Semilla	161.2	1343.33	2:1
Raiz	3.60	4.80	3:1
Tallo	3.15	4.20	3:1
Hoja	5.08	6.77	3:1
Pecíolo	3.10	4.14	4:1
7S	28.5	237.5	
11S	25.05	208.75	

Tabla VI.4 CONSTANTES DE LAS CURVAS DE CALIBRACION DE CADA EXTRACCION

CURVA	PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACION
1	0.010	0.071	0.998
2	0.006	0.053	0.998
3	0.010	0.071	0.897

los cuerpos proteicos de los cotiledones, es por esto que su extracción, a pesar de que se usan en repetidas ocasiones las mismas soluciones amortiguadoras, la solubilidad de estas no resulta ser de manera completa. Para el caso de los tejidos, la cantidad de agua que tienen es mayor, la cantidad de proteína menor y esta se encuentra mucho menos empaquetada, por lo que la eficiencia de extracción es mayor.

Sin embargo, aún tomando en cuenta esta característica de las eficiencias de extracción de la proteína dentro del tejido, se observa que es en el embrión donde se acumula mayor cantidad de

proteína, bastante más que en otros tejidos, el tejido que le sigue, siendo considerablemente menor la cantidad en la hoja.

Derbyshire et al 1976 menciona que en promedio, el porcentaje de proteínas en semillas de leguminosas es del 20-25% de materia seca, y en contraste, un órgano vegetativo típico, tal como es el caso de la hoja tiene sólo del 3 a 5%.

Tradicionalmente la alfalfa ha sido famosa por su alta cantidad de proteína de buena calidad que tiene en sus partes verdes, de hecho por esta razón es tan usada como forrajera, gran porcentaje de esta proteína que se encuentra en la hoja, corresponde a la Rubisco (Kung, S.D.1983), que es la enzima responsable de la fijación del bióxido de carbono en todas las plantas fotosintéticas.

Los demás tejidos de la planta presentan las cantidades de proteína reportadas en la tabla. Del análisis de la misma se observa que para el caso de la semilla, la relación albumina/globulina es de 2:1, mientras que en el caso de los demás tejidos, la relación es mayor, esto quiere decir que la fracción de albúminas predomina en la mayor parte de los tejidos de la planta. Hay que recordar que todas las enzimas de las rutas metabólicas responsables de las actividades de la planta, se encuentran en esta fracción. (Kronchko y Bewley, 1988).

6.6. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE ESPECIFICIDAD DE TEJIDO Y DE ESTADO DE DESARROLLO

Con los antisueros producidos y caracterizada su especificidad, y una vez extraídas y cuantificadas las proteínas de los diferentes tejidos de la planta: raíz, tallo, hoja, peciolo, flor completa, pétalos, columna estaminal y embrión cigótico maduro, se realizaron pruebas de reconocimiento antígeno anticuerpo con antisueros obtenidos para proteínas de reserva contra las proteínas aisladas de los diferentes tejidos de la planta y observar la especificidad de la reacción.

Partiendo de la base de que en los resultados anteriores los

antisueros probados, daban respuesta clara y bien definida contra las proteínas de reserva extraídas de semilla. Como primera fase se probó si había o no reconocimiento entre estos antisueros y los extractos de proteína obtenidos de los diferentes tejidos, mediante inmunodifusión doble. En las figuras 6.10 y 6.11 se observa que estos mismos antisueros no son capaces de reconocer a ningún tipo de determinante antigénico de las proteínas extraídas de los diferentes tejidos que conforman la planta, la única banda de reconocimiento que se presenta es la del control de semilla que se encuentra en los pozos marcados con "5" y "6". Cabe mencionar, que existe una ligera banda de precipitación entre el antisuero y las globulinas de raíz. Figura 6.10 pozo "4", esto puede deberse a que la 7S es una glucoproteína y que en la raíz hay glucoproteínas del tipo de las lectinas cuya proporción de oligosaridos puede ser similar a los oligosacaridos de la proteína 7S, a esto puede deberse el ligero reconocimiento que se presenta con los antisueros.

En la figura 6.12 se presentan los patrones de bandeo obtenidos en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes, de los extractos proteicos de: 1) albúminas de: hoja, peciolo, tallo, raíz, flor completa y columna estaminal, y 2) Globulinas de: hoja, peciolo, tallo, raíz, flor completa y columna estaminal. Los geles tienen como control el patrón de bandeo de la semilla y los marcadores de peso molecular.

De la observación de estos geles se puede concluir que el patrón de bandeo que presentan todos los tejidos, es muy diferente al patrón que presenta la semilla, como es de esperar, se encuentran bandas que tienen pesos moleculares similares, pero por los patrones de bandeo que presentan, corresponden a proteínas diferentes.

Lo anterior coincide con lo reportado por Crouch y Sussex en 1988 para *Brassica napus* y por Criossant y Bopp en 1988 para *Sinapis alba*, en donde se menciona que las proteínas de reserva solo son formadas en los embriones y están ausentes en los demás tejidos.

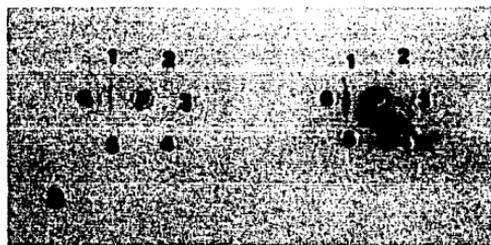
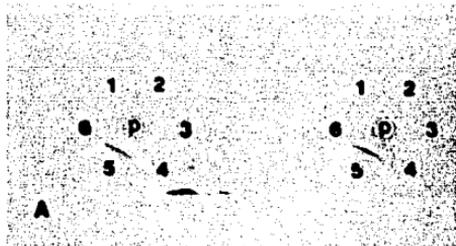


Figura 6.10

Prueba de expresión específica de las proteínas de reserva en diferentes tejidos.

Los pozos (p) contienen Ab "As".

A) Albúminas de: 1-hoja, 2-pecíolo, 3-tallo, 4-raíz, 5-semilla;

B) Globulinas de: 1-hoja, 2-pecíolo, 3-tallo, 4-raíz, 6-semilla

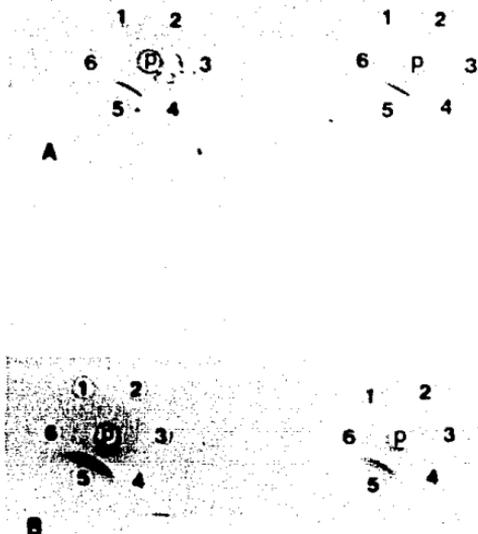


Figura 6.11.

Prueba de expresión específica de las proteínas de reserva de flor.

Los pozos (p) contienen Ab "A2".

A) Albúminas de: 1-columna estaminal, 2-pétalos, 3-flor, 5-semilla; B) Globulinas de: 1-columna estaminal, 2-pétalos, 3-flor completa.

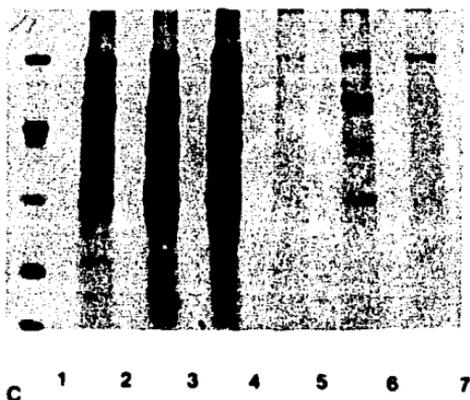
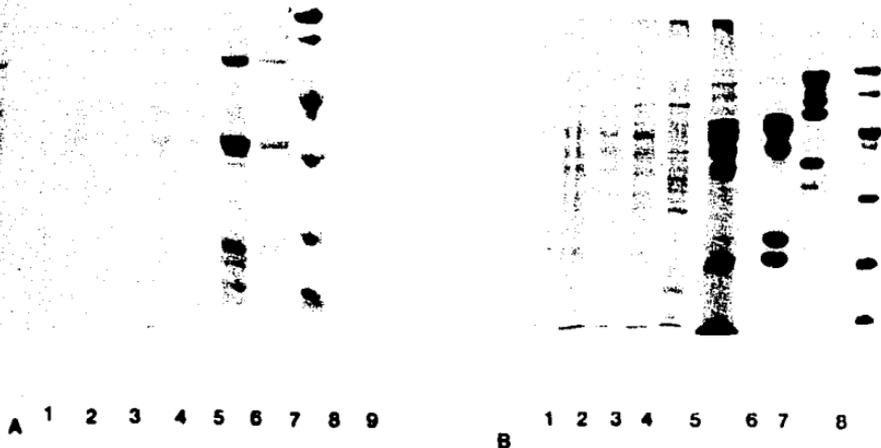


Figura 6.12

Patrón electroforético de proteínas de los diferentes tejidos que conforman la planta.

A) 1 y 2: Alb. y Glob. de hoja, 3 y 4: Alb. y Glob. de peciolo, 5 y 6: Alb. y Glob. de tallo, 7 y 8: Alb. y Glob. de raíz, 9: marcadores; B) Globulinas de: 1-hoja, 2-peciolo, 3-tallo, 4-raíz, 5-semilla, 6-11S, 7-7S, 8-marcadores; C) 1-marcadores, Albúminas de: 2-columna estaminal, 6-pétalos, 7-flor completa.

Los patrones de bandeado caracterizados de los geles, se tomaron como base para correr nuevos geles, los cuales se transfirieron a papel de nitrocelulosa y luego se realizó con estos una inmunodetección usando los antisueros que se tenían caracterizados. Se seleccionaron los sueros "Ca" y "Cb" correspondientes al tercer esquema, cabe aclarar que no fue el esquema que presentó mayor especificidad pero una de las razones por las cuales se utilizó estos lotes fue que los del primer esquema resultaron insuficientes para realizar todas las pruebas necesarias y dentro del tercer esquema estos fueron los sueros que presentaron mayor grado de especificidad y título. En la figura 8.13 se muestran las transferencias en papel de nitrocelulosa correspondientes al estudio de especificidad de tejido, del análisis de los resultados se puede deducir que las bandas de reconocimiento de los antisueros con las proteínas separadas en el papel, fueron muy escasas, a pesar de que esta técnica tiene alta sensibilidad y especificidad.

En algunos casos existió reacción cruzada, esto es normal considerando que se trabaja con antisueros policlonales y con extractos completos de los diferentes tejidos, sin embargo el grado de reconocimiento en todas las bandas del patrón de semilla es muy diferente al escaso reconocimiento con otros tejidos.

Aceptando la posibilidad de que un antisuero dado tiene el potencial para reaccionar con más de una proteína cuando tales proteínas tienen algún epítotope en común, un suero no puede ser enteramente de 100% de especificidad. Múltiples bandas pueden ser sólo parcialmente explicadas por el factor que el tratamiento con SDS causa la desnaturalización de proteínas, originando que algunas reacciones cruzadas o uniones no específicas puedan también ocurrir (Cohn y Mitchel 1986).

Del estudio de especificidad de tejido hecho por inmunodifusión doble en placas de agarosa, por caracterización de los patrones de bandeado en geles de poliacrilamida y por inmunodetección en papel de nitrocelulosa, se puede concluir que las proteínas de reserva

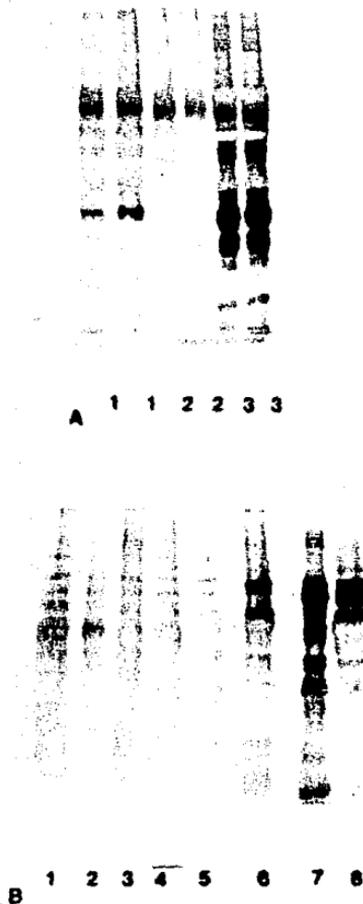


Figura 6.13

Inmunodetección en papel de nitrocelulosa de las proteínas de semilla y los diferentes tejidos que conforman la planta.

A) Globulinas de: 1-semilla, 2-11S, 3-7S; B) globulinas de: 1-hoja, 2-pecíolo, 3-tallo, 4-raíz, 5-flor, 6-semilla, 7-7S, 8-11S.

son sintetizadas únicamente durante el proceso de embriogénesis, y que no aparecen en ningún otro tejido de la planta, ni en ninguna otra fase de desarrollo, ni siquiera en la flor completa o en la columna estaminal, es decir, son específicas del tejido y también del estado de desarrollo de la planta. Datos similares son reportados por Crouch y Sussex (1981) para *Brassica napus* y por Croisant y Bopp (1988) para *Sinapis alba*.

6.7. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN EMBRIONES SOMATICOS

La condición ya demostrada, de que las proteínas de reserva sean específicas de tejido y de estado de desarrollo, las hacen muy buenos marcadores bioquímicos de la embriogénesis, ya que son productos que sólo se producen durante este proceso, que se acumulan en grandes cantidades y que son el producto final de una serie de genes que están regulados por procesos de diferenciación y desarrollo.

Resulta importante analizar, con estos mismos métodos de alta especificidad y sensibilidad, utilizando lotes de antisueros altamente selectivos, si estas proteínas son sintetizadas en los embriones somáticos que se obtienen por cultivo de tejidos.

En las figuras 6.14 y 6.15 se muestran los estudios de doble difusión hechos con extractos de embriones somáticos, desarrollados bajo diferentes condiciones. Se muestran los resultados con proteínas extraídas de callo, de embriones somáticos desarrollados en medio con reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) (Fig. 6.14 B), de embriones somáticos desarrollados en medio sin reguladores (Fig. 6.15 B). De esta primera fase se puede discutir que cuando los embriones se desarrollan en ausencia de reguladores, si son capaces de sintetizar a las proteínas de reserva, sin embargo, cuando se desarrollan con los reguladores, la síntesis de estas proteínas se ve disminuida, es por esto que en el sistema de obtención de embriones somáticos por cultivo de tejidos se emplea un protocolo de dos medios, con el objeto de incrementar la calidad de los

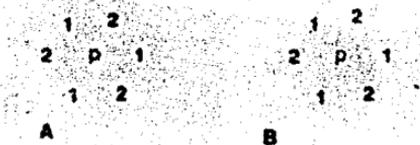


Figura 8.14

Expresión de proteínas de reserva de embriones somáticos producidos bajo diferentes condiciones de desarrollo en presencia de reguladores de crecimiento.

Todos los pozos 1 contienen Ab "A1" y los pozos 2 Ab "A2".

A) p-globulinas de callo; B) p-globulinas de embriones somáticos

C) p-globulinas de embriones somáticos desarrollados en

condiciones de obscuridad; D) p-globulinas de embriones

somáticos desarrollados en presencia de ABA; E) p-globulinas de

embriones somáticos desarrollados en presencia de PEG.

embriones producidos en terminos de estructuras más normales y de síntesis de material de reserva, el protocolo establecido consiste de dos medios, el de inducción, donde se siembran los peciolo en contacto con los reguladores de crecimiento durante dieciocho días, y el de desarrollo, donde los callos obtenidos durante estos 18 días, son transportados a un medio libre de reguladores para favorecer el desarrollo de embriones de mejor calidad.

En estudios subsecuentes se hicieron pequeñas manipulaciones al medio de desarrollo, con el objeto de ver si estas variaciones tenían algún efecto sobre la síntesis de las proteínas de reserva en los embriones somáticos, estas fueron: desarrollar los embriones en oscuridad, utilizar un inductor del estrés hidrico como el polietilenglicol (PEG.), en el medio de desarrollo poner manitol como sustituyente de una parte de la sacarosa.

Los resultados de estos estudios se muestran en las figuras (6.14 C-E) y (6.15 C-E). De la observación de las placas se deduce que hay un ligero aumento en la síntesis de proteínas de reserva en embriones somáticos desarrollados en ausencia de luz, en presencia de PEG y en presencia de manitol, siempre y cuando no haya reguladores de crecimiento en el medio, las demás manipulaciones parecen no tener un efecto a nivel cualitativo, aunque podrían influir sobre la calidad de proteína que es sintetizada por los embriones somáticos.

Sung et al., 1983 en Peña 1988 menciona al respecto que uno de los factores que limitan la obtención de embriones somáticos de alta calidad, es la continua acción de los reguladores de crecimiento (principalmente el 2,4-D), durante el desarrollo de los embriones somáticos. Una vez que el proceso embriogénico se ha disparado, la acción del 2,4-D puede redundar en la obtención de embriones anormales, alta asincronía y en algunas especies, inhibir el desarrollo embrionario a menos que se elimine o disminuya la concentración de auxina en el medio de cultivo.

Fischer et al., 1987 demostraron para *Sinapsis alba*.L. que tratamientos con ácido abscísico (ABA) y otras condiciones de

stress, tales como la disminución del contenido de humedad, puede estimular a los embriones para continuar o para reanudar al síntesis de proteína de reserva.

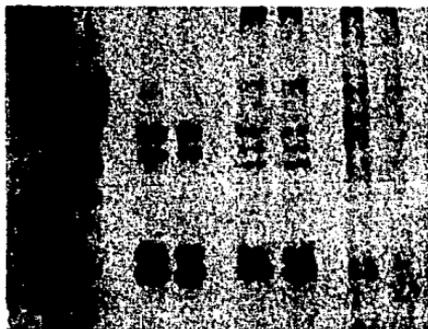
Crouch y Sussex (1981) por su parte sugieren que el ácido abscísico (ABA) o una alta presión osmótica también inhiben la germinación precos.

En la figura 6.16 se encuentra el patrón de bandeo de los extractos de proteína de embriones somáticos y cigóticos y como control, los patrones de bandeo de las proteínas 7S y 11S purificadas. Es importante hacer notar que en este gel los patrones de bandeo de los dos embriones, son extremadamente similares, se identifican las bandas de las proteínas de reserva, aunque evidentemente estas se encuentran en niveles mucho más bajos que en los embriones cigóticos.

Stuart et al., 1988 para *Medicago sativa* L. y Crouch, 1982 para *Brassica napus* reportan que en embriones somáticos bajo las mejores condiciones, máximo expresan solo una décima parte de los niveles de proteína de reserva de la semilla.

En la figura 6.17 se observan los resultados de los estudios de transferencia a papel de nitrocelulosa e inmunodetección de los patrones de globulinas en embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo: globular-corazón, torpedo joven, torpedo maduro y cotiledonar, también están las proteínas del callo, en esta transferencia se puede observar la reacción cruzada que todas las bandas del patrón tuvieron con los antisueros específicos de la semilla.

Los resultados obtenidos por inmunodetección concuerdan con los patrones de bandeo obtenidos en los geles, lo que demuestra que las proteínas de reserva son sintetizadas en los embriones somáticos, pero que no se acumulan en los mismos niveles, además resulta muy interesante recalcar que la expresión de las proteínas de reserva en somáticos ocurre desde fases muy tempranas en el desarrollo, ya que desde el estado corazón-globular, fué posible



1 2 3 4

Figura 6.16

Patrón de bandeo de las proteínas de reserva en gel de poliacrilamida-SDS.

1-7S; 2-11S; 3-Glob. de semilla; 4-Glob. de embrión somático.

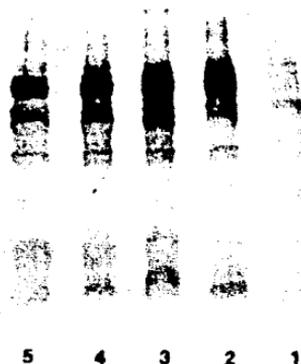


Figura 6.17

Immunodetección en papel de nitrocelulosa de proteínas de reserva de embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo
1-callo; 2-corazón globular; 3-torpedo joven; 4-torpedo maduro;
5- cotiledonar.

detectar bandas de reconocimiento.

Por otro lado en la figura 6.18 también se puede observar por inmunodetección cual fue la respuesta de los embriones somáticos al ser desarrollados en condiciones de obscuridad y de fotoperiodo. Se puede observar que en los embriones desarrollados en condiciones de fotoperiodo hay una degradación de las proteínas del día 39 al día 42 y no hay una acumulación como ocurre en los embriones cigóticos. En aquellos embriones desarrollados en condiciones de obscuridad es notorio que al llegar al día 42 aun pueden ser reconocidas las proteínas de reserva, lo que nos indica que bajo estas condiciones las proteínas tardan más tiempo en ser degradadas.

6.8 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DURANTE LA ONTOGENIA DE EMBRIONES SOMATICOS Y CIGOTICOS

Una vez demostrada la expresión de las proteínas de reserva en embriones somáticos se procedió a estudiar en que momento empiezan estas a sintetizarse tanto en los embriones cigóticos como en los somáticos, con el objeto de que este fuera un estudio comparativo se siguieron las cinéticas de expresión en estados homólogos de desarrollo. La selección de estados homólogos ya ha sido discutida en las primeras secciones de este capítulo.

Los resultados de este estudio comparativo a nivel de inmunodifusión doble, se encuentra en la figura 6.19, el análisis de la misma nos dice que las proteínas comienzan primero a ser detectadas en la fracción de albúminas desde los días 30 en los embriones cigóticos y desde el día 21 en somáticos. (6.20 B). La fracción de globulinas se detecta un poco más tarde, lo que indica que después de su síntesis ocurre un proceso de empaquetamiento, lo que las hace aparecer en la fracción de globulinas.

En la figura 6.20 se observan los patrones de bandeó obtenidos en geles de poliacrilamida para las cinéticas de desarrollo de embriones somáticos y cigóticos, de las observaciones de estos geles se puede deducir que la síntesis de las proteínas de reserva

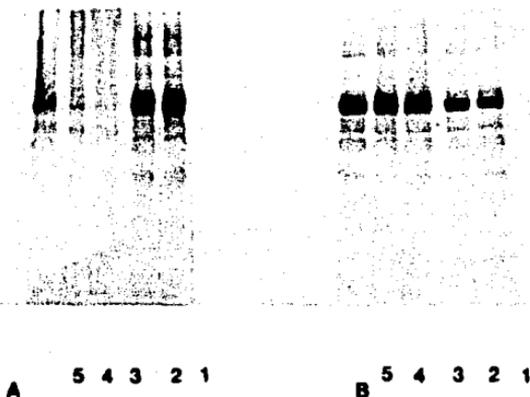


Figura 6.18

Inmudetección en papel de nitrocelulosa de proteínas de reserva en embriones somáticos desarrollados en diferentes condiciones:

A) Embriones somáticos desarrollados en condiciones de fotoperiodo:

1-torpedo joven 39 días; torpedo maduro 39 días; 3-torpedo joven 42 días; 4-torpedo maduro 42 días; 5-torpedo tardío 42 días.

B) Embriones somáticos desarrollados en condiciones de oscuridad:

1-torpedo joven 39 días; 2-torpedo maduro 39 días; 3-torpedo joven 42 días; 4-torpedo maduro 42 días, 5-torpedo tardío 42 días.



Figura 6.19

Expresión de las proteínas de reserva durante la ontogenia del embrión cigótico

Los pozos (p) contienen Ab "Az"

A) Alb. de embrión cigótico de: 1-15 días; 2-30 días; B) Glob. de 1-15 días, 2- 30 días; C) Alb. de 1-45 días, 2-60 días; D) Glob. de 1-45 días, 2-60 días.

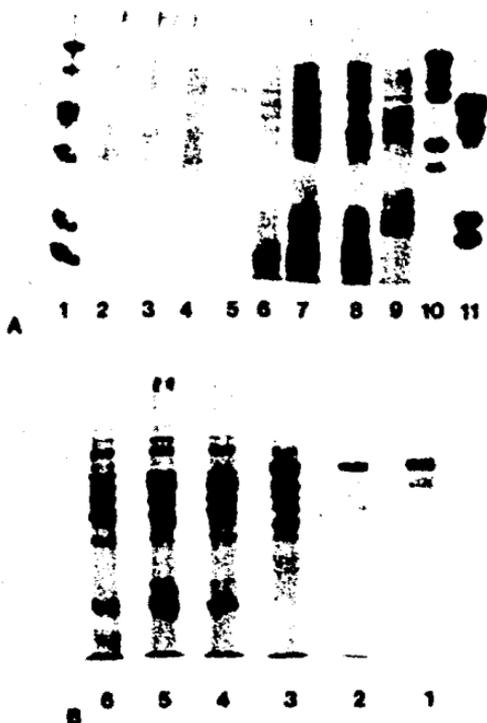


Figura 6.20

Patrón de bandeo de las proteínas de reserva producidas por embriones cigóticos y somáticos en sus respectivas cinéticas de desarrollo.

A) Cinética de embriones cigóticos:

1-marcadores, 2-columna estaminal, 3-pétalos, 4-flor completa, embriones cigóticos de 5-15 días, 6-30 días, 7-45 días, 8-60 días, 9-globulinas de embrión somático; 10-7S; 11-11S.

B) Cinética de embriones somáticos:

Globulinas de: 1-globular corazón de 21 días, 2-torpedo joven de 27 días, 3-globular corazón de 30 días, 4-torpedo joven 33 días, 5-torpedo maduro 36 días, 6-cotiledonar joven 39 días

es un proceso precoz en embriones somáticos, en estos la expresión se detecta desde fases muy tempranas en el desarrollo, pero también ocurre un fuerte recambio, ya que en estado cotiledonar hay una disminución de las bandas de estas proteínas, lo que sugiere una síntesis muy temprana y una degradación muy rápida. (Fig. 6.20 B).

En el caso de los embriones cigóticos, (6.20 A) a síntesis de las proteínas de reserva comienza en una fase más tardía del desarrollo de los mismos, hasta el estado de torpedo joven, que es donde los cotiledones comienzan a crecer, esto ocurre entre los días 15 y 30 post antesis, sin embargo, en este caso no hay recambio y las proteínas comienzan a acumularse en los cotiledones. El estado cotiledonar (a los 45 días) en embriones cigóticos se caracteriza por tener altos niveles de proteína de reserva altamente empaquetada, esta es una diferencia significativa en las ontogenias, mientras que los embriones cigóticos acumulan, los embriones somáticos degradan, esto puede deberse en parte a las condiciones de desarrollo *in vitro* y en el medio ambiente natural, son muy diferentes.

En la figura 6.21 se encuentran los resultados de los estudios de inmunodetección en papel de nitrocelulosa para la ontogenia de los dos tipos de embriones, los resultados confirman lo que ya ha sido discutido para los patrones de bandeo de los geles.

En este caso, el estudio inmunológico de la expresión de la proteínas de reserva en embriones cigóticos abarca desde la formación de la flor, el aislamiento de la columna estaminal y los extractos de 15, 30, 45 y 60 días post antesis, como controles se encuentran los patrones de semilla y embrión somático.

Por lo tanto, se puede resumir, que las proteínas de reserva si son sintetizadas en los embriones somáticos si estos se desarrollan en un medio libre de reguladores de crecimiento, que su expresión se inicia desde etapas muy tempranas del desarrollo, a diferencia de los embriones cigóticos, donde la síntesis se inicia más tardíamente, que los niveles de acumulación son muy

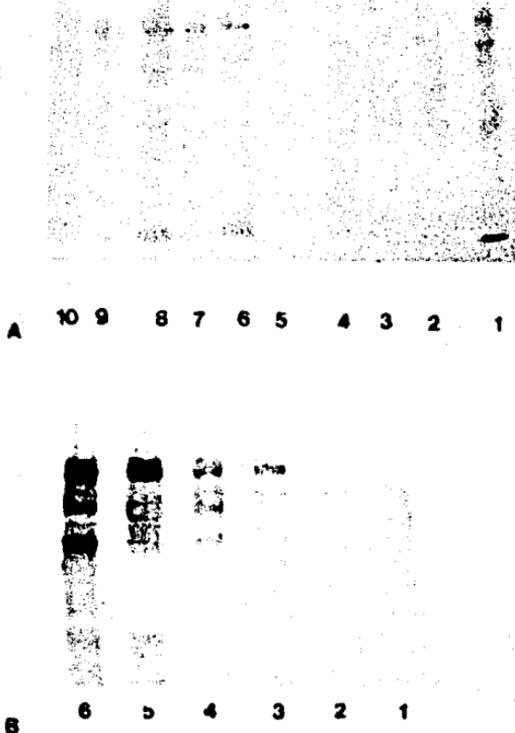


Figura 6.21

Inmunodetección en papel de nitrocelulosa de las proteínas de reserva producidas por embriones cigóticos y embriones somáticos en sus respectivas cinéticas de desarrollo.

A) Cinética de embriones cigóticos:

1-marcadores; Globulinas de: 2-flor completa, 3-pétalos, 4-columna estaminal; embriones cigóticos de: 5-15 días, 6-30 días, 7-45 días, 8-60 días, 9-semilla, 10-embrión somático.

B) Cinética de embriones somáticos:

Globulinas de: 1-callo de 21 días, 2-fracción densa 27 días, 3-globular-corazón de 30 días, 4-torpedo joven 33 días, 5-torpedo maduro 36 días, 6-cotiledonar joven 39 días.

bajos y que estas proteínas están sujetas a gran recambio en embriones somáticos, los cuales, evidentemente no están en latencia, otra diferencia significativa ya que los embriones cigóticos si entran en latencia y acumulan las proteínas de reserva como bloque de nitrógeno a utilizar durante la germinación.

Resulta muy interesante, dadas estas diferencias bioquímicas encontradas durante este estudio, el hacer estudios comparativos a nivel de microscopía óptica y electrónica para ver si la ultraestructura apoya lo que la bioquímica y la inmunología nos sugieren acerca de las semejanzas y las diferencias entre la embriogénesis que ocurre en forma natural y que da lugar a la formación de la semilla y la que ocurre *in vitro*, a través del cultivo de tejidos, dando lugar a embriones somáticos, que desde el punto de vista biotecnológico, podrían ser fuente de semillas artificiales, con el enorme potencial que ello plantea.

6.9. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

En este trabajo se hizo un estudio comparativo a nivel de microscopía óptica y electrónica de embriones somáticos y cigóticos en estados homólogos de desarrollo, en el caso de los embriones somáticos se seleccionaron dos fases dentro del proceso de desarrollo: el estado de torpedo maduro en embriones de cinco semanas de cultivo (35 días) y el estado cotiledonar, en embriones de seis semanas en cultivo (42 días). La selección de estas dos fases se basó en los resultados del análisis bioquímico: los embriones de 35 días fueron los que presentaron índices más altos de acumulación de material de reserva y las características morfológicas más similares a la fase de torpedo del embrión cigótico.

Durante el estado de 42 días ya existe una tendencia muy marcada hacia la germinación, los niveles de material de reserva son muy bajos y en los cotiledones comienza una fase de degradación.

Para los embriones cigóticos, se seleccionaron embriones de 60 días post antesis, donde la semilla ha alcanzado máxima madurez y acumulación de material de reserva.

El objetivo de este estudio fué hacer una comparación de los niveles de organización celular y subcelular de embriones somáticos y cigóticos que hubieren alcanzado su máximo grado de madurez bajo diferentes condiciones, en el primer caso *in vitro*, mientras que en el segundo caso *in vivo*. En primera instancia se observaron características estructurales que fueran evidencia de funciones celulares definidas y que fueran evidencia de la actividad metabólica de las células, como segundo punto se buscaron evidencias del grado de acumulación de material de reserva. En forma específica durante la observación de las preparaciones se buscó la presencia de gránulos de almidón y de proteínas de reserva, se observó el grado de acumulación de material electrodenso dentro de la vacuola y la existencia de cuerpos proteicos tanto en embriones somáticos como cigóticos.

El estudio comparativo se realizó a dos niveles: la comparación entre eje embrionario de embriones somáticos y cigóticos y la comparación a nivel de los cotiledones, en ambos casos se analizaron cortes transversales y longitudinales.

En algunos casos el nivel de aumento requerido para observar con mayor detalle las diferentes estructuras, hacía que se perdiera la imagen del corte, para estos casos se tomaron fotografías del detalle de las diferentes regiones y se construyeron mapas para reproducir el corte original.

Con este método de construcción de mapas se realizó el mapa de la estructura longitudinal del embrión somático, se fotografiaron las diferentes regiones a lo largo de un corte longitudinal posteriormente se ensamblaron para obtener el corte total. La fotografía resultante se puede observar en la figura 6.22. y en la figura 6.23 se observa el esquema de un embrión cigótico. De la comparación de ambas estructuras se puede observar que la relación en volumen de los cotiledones con respecto al eje

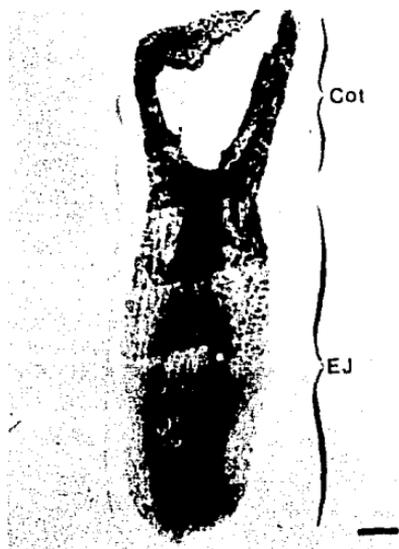


Figura 6.22

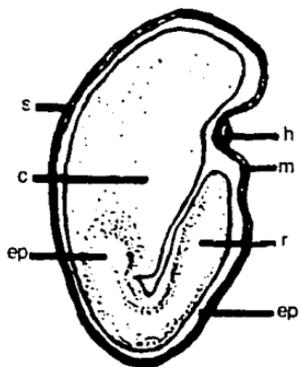


Figura 6.23

Figura 6.22

Corte longitudinal de embrión somático a los 35 días de desarrollo. Se muestra la diferencia en tamaño de los cotiledones (Cot.) con respecto al eje embrionario (EJ). (Azul de toluidina).

Barra = 100 μ m

Figura 6.23

Diagrama de semilla de alfalfa: c-cotiledón, en-endospermo, ep-epicótilo, h-hilo, m-micrópilo, r-radícula (hipocótilo), s-s-cubierta seminal (lesta). Tomado de Henson, C. 1972.

embrionario es muy grande en el embrión sexual, en este caso el eje ocupa aproximadamente un 8% del volumen total del embrión, en el caso del embrión somático el eje embrionario predomina sobre los cotiledones, en la figura se puede observar que estos están poco desarrollados en comparación con el eje embrionario.

Observaciones similares fueron reportadas por Dos Santos *et al.*, 1983 para *Medicago sativa* L. y por Hakman, 1987 para *Picea glauca* y *P. marina*.

En el eje embrionario ya se pueden distinguir las etapas tempranas de diferenciación del haz vascular y del meristemo apical, sin embargo, los cotiledones han alcanzado un escaso grado de desarrollo.

6.9.1. COMPARACION DEL EJE EMBRIONARIO DE EMBRIONES SOMATICOS Y CIGOTICOS

En la figura 6.24 se observa el mapa construido para el eje embrionario del embrión somático y en la figura 6.25 para el del embrión cigótico. En el caso del eje embrionario de embrión somático (6.24) se distinguen tres regiones (una amplificación se muestra en la fig. (6.26), la región externa caracterizada por células muy vacuoladas y con poco empaquetamiento, la región intermedia caracterizada por células con un mayor grado de empaquetamiento, poco vacuoladas y con evidente acumulación de almidón, que se visualiza como gránulos de color oscuro, y una región central con células muy empaquetadas, sin vacuolas y sin gránulos de almidón, se observan también los inicios de lo que serán los haces vasculares (tejido provascular).

En el corte del eje embrionario de embrión cigótico (Fig. 6.27) se distinguen: una epidermis pluriestratificada cubierta por una cutícula y una región interna de células de parénquima con citoplasma denso que muestra un evidente grado de acumulación de material de reserva.

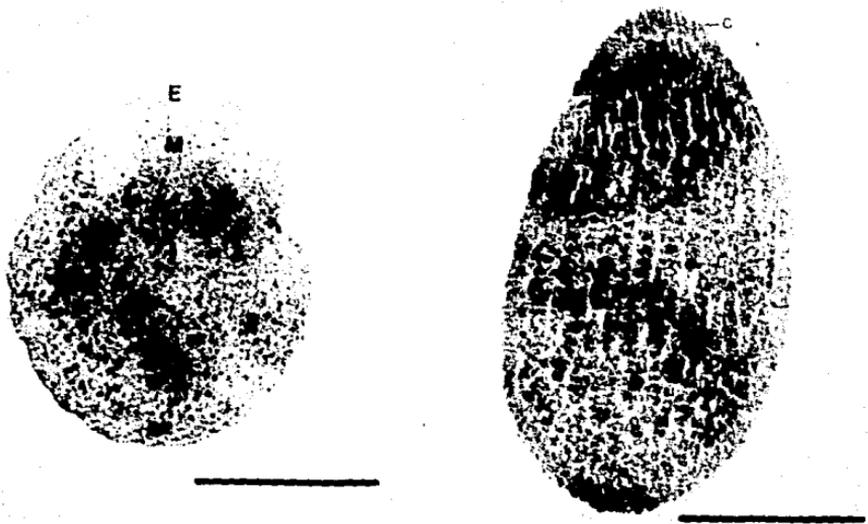


Fig. 6.24

Fig. 6.25

Figura 6.24

Corte transversal de eje embrionario a 35 días de desarrollo. Células externas (E) poco teñidas y muy vacuoladas, las células intermedias (M) poco vacuoladas y abundantes granulos de almidón; células internas (I) con citoplasma denso, muy teñidas, no vacuoladas y sin granulos de almidón. (Azul de toluidina)

Barra = 200 μ m

Figura 6.25

Corte transversal de eje embrionario de embrión cigótico a los 60 días de desarrollo: Cutícula (c); epidermis (cep); células de parenquima (cep) con citoplasma denso. (Azul de toluidina)

Barra = 100 μ m

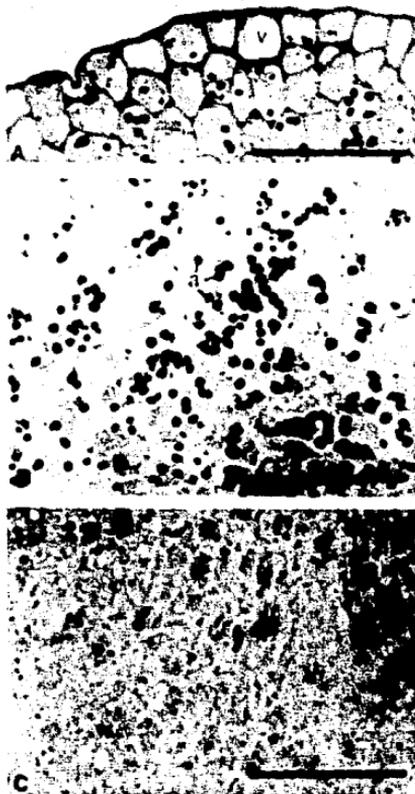


Figura 6.26

Corte transversal de eje embrionario de embrión somático a los 35 días de desarrollo, en donde se observa en mayor detalle: A) región externa muy vacuolada (V); B) región media, poco vacuolada y abundantes granulos de almidón (A); C) región interna con células no vacuoladas, con citoplasma denso y pocos granulos de almidón. (Azul de toluidina) Barra = 50 μ m

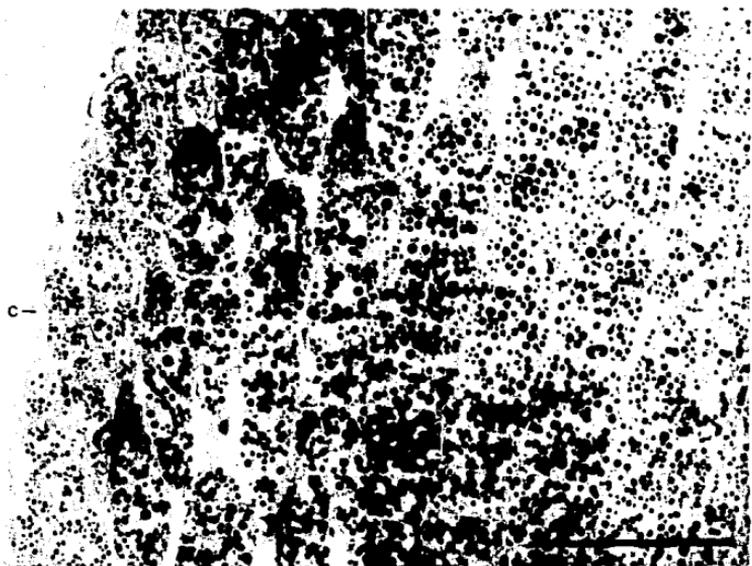


Figura 6.27

Corte transversal de eje embrionario de embrión cigótico a los 60 días de desarrollo: Cutícula (c); epidermis (ep), células de parénquima (cp) con citoplasma denso y abundante material de reserva, como cuerpos proteicos (cp). (Azul de toluidina).

Barra = 50 μ m

Las estructuras subcelulares, a nivel de microscopía electrónica se pueden observar en las figuras 6.28 - 6.30. De manera general se pueden deducir algunas similitudes entre las células del eje embrionario de embriones somáticos (Figs. 6.29) y cigóticos (Fig. 6.28 A), las células son pequeñas, poco vacuoladas e isodiamétricas, en ambos casos hay una gruesa pared celular, sin embargo, en los embriones somáticos esta pared es atravesada por gran cantidad de plasmodesmos lo que indica una comunicación intercelular (Fig. 6.29 A, B y D y 6.30)

Los plasmodesmos están considerados como modificaciones del retículo endoplasmico liso que interconecta unas células con otras y que intervienen en la difusión de nutrientes (Halperin y Jensen, 1967; Newcomb, 1980 en Hernandez 1989).

Los embriones somáticos presentan núcleos grandes rodeados por su doble membrana nuclear y nucleolos electrodensos bien definidos (Fig.6.29 D). También se presentan otras estructuras como mitocondrias (Fig. 6.29 A, B y D), dictiosomas (Figs.6.29 C y 6.30 A) y microtúbulos (Figs. 6.29 C y 6.30 B), las células son poco vacuoladas y se observa gran cantidad de plastos conteniendo de 3 a 15 granulos de almidón (Figs. 6.29 A y B)

Otra estructura muy frecuente en los embriones somáticos fueron los cuerpos mielínicos (multicapa de membranas concéntricas) (Figs. 6.29 D y 6.30 A).

Estas mismas estructuras han sido reportadas por Street y Wither, 1974 y Street H.E. 1977 en células de embriones somáticos de *Ranunculus*.

Vigil E.L. *et al.*, 1985 también hace referencia a estas estructuras mencionando que los cuerpos proteicos contienen enzimas hidrolíticas y funcionan, al menos durante la germinación, como vacuolas autofágicas. La presencia de los cuerpos mielínicos en la formación de los cuerpos y vesículas presenta una evidencia estructural en apoyo a la función autofágica para los cuerpos proteicos.

Los embriones cigóticos por su parte carecen casi completamente

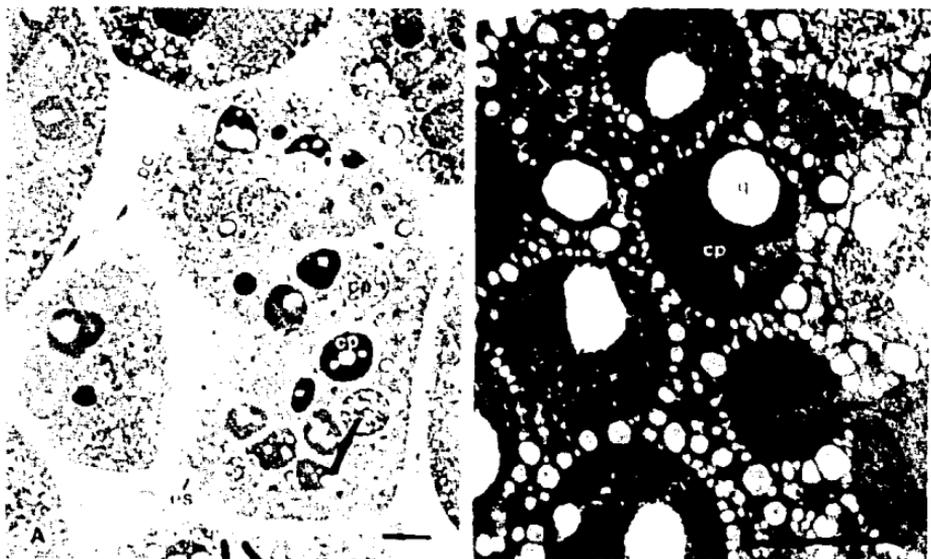


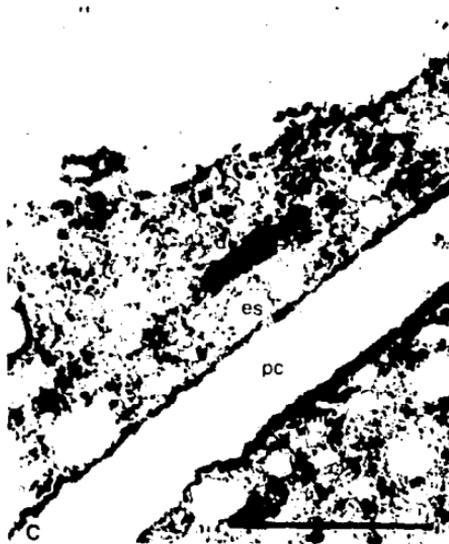
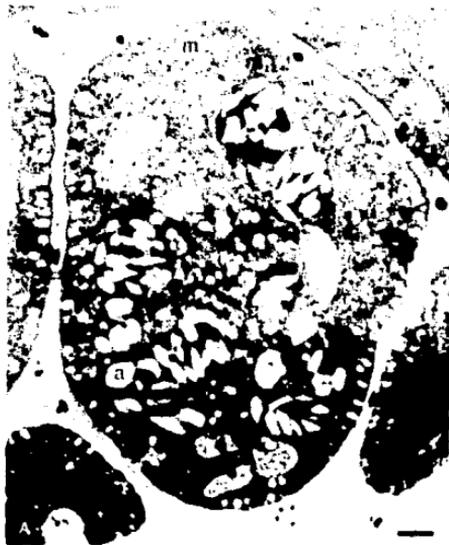
Figura 6.28

Ultraestructura de las células de eje embrionario de embrión cigótico a 60 días de desarrollo: Abundantes cuerpos proteicos (cp), algunos de los cuales presentan cavidades que corresponden a globoides (cg) y abundantes esferosomas (es). Barra = 3 μ m

Figura 5.29

Detalles ultraestructurales de células de eje embrionario de embrión somático: A) Abundantes plastos hasta con 15 granulos de almidón (a), esferosomas (es); plasmodesmos (flechas), mitocondrias (m). B) Vacuolas (v); plastos con varios granulos de almidón (a), plasmodesmos (flechas), mitocondrias C) Pared celular (pc), microtúbulos (mt), dictiosomas (d) con 5 cisternas, esferosomas (es), gran cantidad de ribosomas (r). D) Pared celular (pc), cuerpo proteico (cp), núcleo grande (n) con nucleolo electrodens (nu); plasmodesmos abundantes (flechas), tres cuerpos mielínicos (cm); esferosomas (es), dictiosomas (d), mitocondrias (m).

Barra = 1 μ m



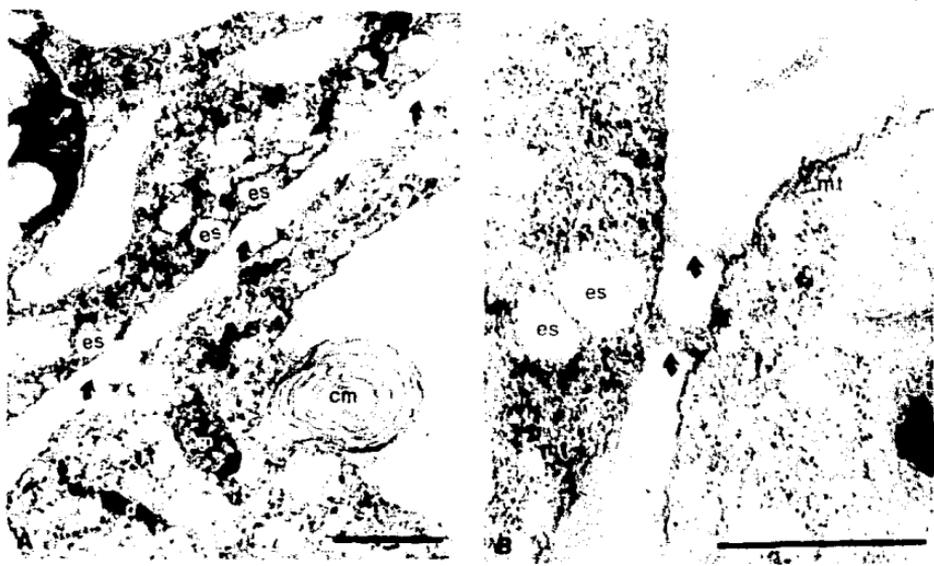


Figura 6.30

Eje embrionario de embrión somático a 35 días de desarrollo:
 A) Plasmodesmos abundantes (flechas), mitocondrias (cm), dictiosomas (d), esferosomas (es), cuerpo mielinico (cm). B) Esferosomas (es); microtúbulos (mt), plasmodesmos (flechas), ribosomas (r).
 Barra = 1 µm

de organelos y todo el citoplasma es ocupado por los cuerpos proteicos rodeados de esferosomas (Fig. 6.28 A y B).

Los cuerpos proteicos se encuentran llenos de proteína de reserva y algunos muestran cavidades que corresponden a globoides (inclusiones de ácido fítico) (Pernollet J-C, 1978; Vigil et al., 1985; Le Gal y Rey, 1986; Ericson M. et al., 1989).

6.9.2. COMPARACION ENTRE LOS COTILEDONES DE EMBRIONES SOMATICOS Y CIGOTICOS

Con el mismo objetivo que para el eje embrionario, se realizó el estudio comparativo en cortes transversales de cotiledones de embriones somáticos y cigóticos, en estados similares de desarrollo. En las figuras 6.31 y 6.32 se pueden observar los cortes que muestran la morfología general del cotiledón, los cotiledones de los embriones cigóticos (Fig. 6.32) están separados y forman dos estructuras independientes, en la fotografía sólo se muestra uno de ellos, mientras que para el caso de los embriones somáticos (Fig. 6.31), los cotiledones están fusionados, por lo que en la fotografía aparecen los dos al estar unidos y por el tipo de corte transversal, la fotografía muestra una estructura que se asemeja a una dona, sin embargo, esto no se puede generalizar para todos los embriones somáticos. En las figuras 6.33 y 6.34 se observan las diferentes regiones de estas mismas estructuras empleando un aumento mayor. En estas fotografías se puede observar que es en los cotiledones donde se presenta una mayor diferencia entre los dos sistemas de embriogénesis. Las células que forman los cotiledones de los embriones somáticos (Fig. 6.33) son isodiamétricas, altamente vacuoladas y contienen granulos de un material muy electrodensos.

En las fotografías que corresponden al embrión cigótico (Fig. 6.34) se muestra una organización celular muy diferente, en este caso se observa una epidermis monoestratificada cubierta por una cutícula, de dos a tres estratos de células de parénquima en empalizada seguidas de parénquima esponjoso. En el interior de las

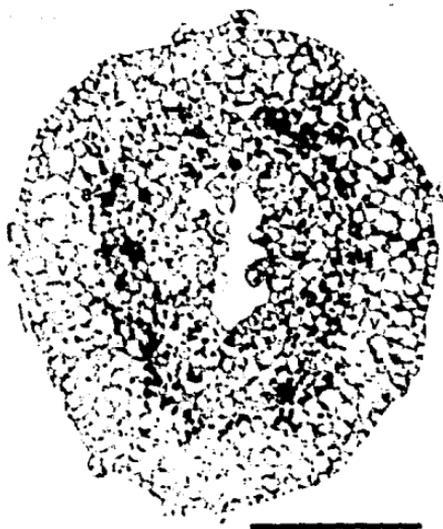


Figura 6.31

Figura 6.31

Corte transversal de cotiledón de embrión somático a 35 días de desarrollo: Cotiledones fusionados, formados por células de parénquima muy vacuoladas (v) conteniendo granulos de almidón (a). (Azul de toluidina)
Barra = 2 μ m



Figura 6.32

Figura 6.32

Corte transversal de cotiledón de embrión cigótico a los 89 días de desarrollo: Cotiledones separados (en este caso solo se muestra uno) formados por: epidermis (ep), parénquima en empalizada (pe) y parénquima esponjoso (ps). (Azul de toluidina).
Barra = 200 μ m

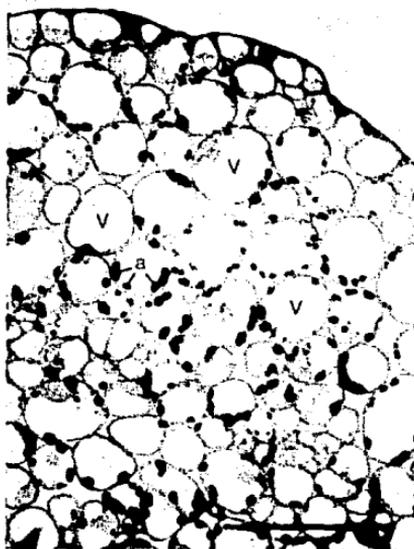


Figura 6.33

Corte transversal de cotiledón de embrión somático a los 35 días de desarrollo: Se observan en mayor detalle las células de parénquima, de diferentes tamaños, muy vacuoladas (v) y conteniendo granulos de almidón. (Azul de toluidina)

Barra = 50 μ m



Figura 6.34

Corte transversal de cotiledón de embrión cigótico a los 60 días de desarrollo en donde se observa en mayor detalle las células que lo forman: Cutícula (c), epidermis monoestratificada (ep), células de parénquima en empalizada (pe), parénquima esponjoso (pes) y finalizando con una capa de epidermis (ep) y cutícula (c). (Azul de toluidina)

Barra = 50 μ m

células se puede observar gran cantidad de material de reserva que las hace lucir muy oscuras.

Detalles ultraestructurales de las células que forman el cotiledón de embriones sexuales se pueden observar en las figuras 6.35 - 6.38, en todas ellas se pone en evidencia la existencia de cuerpos proteicos ocupando casi la totalidad del citoplasma, que son las vacuolas llenas de proteína de reserva altamente empaquetada, lo que da la apariencia de granulos muy oscuros al microscopio electrónico, los núcleos de estas células son pequeños, ameboides irregulares y solo en algunos casos se pueden distinguir nucleolos (Figs. 6.35 y 6.36)

En la figura 6.36 A y B se pueden observar conjuntos de células que podrían corresponder a células de procambium (Laguna H.G. 1991, comunicación personal).

Un cuerpo proteico con un mayor grado de amplificación se puede observar en la figura 6.38 C lo que permite distinguir la doble membrana que lo rodea así como el alto grado de empaquetamiento de material de reserva que se encuentra depositado en él y que corresponde a las proteínas de reserva 7S y 11S (Chrispeel M.J. et al., 1976; Craig y Goodchild, 1984; Krochko y Bewley, 1988; Gayler K.R. et al., 1989; Lending C.R. et al., 1989).

Además de los cuerpos proteicos que son muy evidentes en todas las células que constituyen el cotiledón, se observan esferosomas distribuidos en alta cantidad en todo el citoplasma, dentro de estos se encuentra almacenado otro tipo de material de reserva como lípidos.

En las figuras 6.39 - 6.45 se encuentran las características ultraestructurales de las células que conforman el cotiledón del embrión somático: en ellas se pueden distinguir grandes vacuolas en las cuales el depósito de material electrodensito, si bien es evidente que existe, es escaso (Fig. 6.40 A y B, 6.41 A y 6.42 A). Dentro de las células se encuentran los cuerpos proteicos, figuras 6.41 B y 6.42 A y B, pero estos no son tan abundantes como el caso de los embriones cigóticos.

Figura 6.35

Detalles ultraestructurales de células de cotiledón de embrión cigótico a los 80 días de desarrollo: A) Cutícula (c), las células que forman la epidermis (E) son pequeñas e isodiamétricas, seguida de la epidermis hacia el interior se encuentran las células de parénquima de mayor tamaño (P). En ambos tipos de células los cuerpos proteicos (cp) y los esferosomas (es) son abundantes. B) Células de parénquima en empalizada con abundantes cuerpos proteicos (cp) y esferosomas (es). En todos los casos el núcleo es pequeño y ameboide.

Barra = 5 μ m

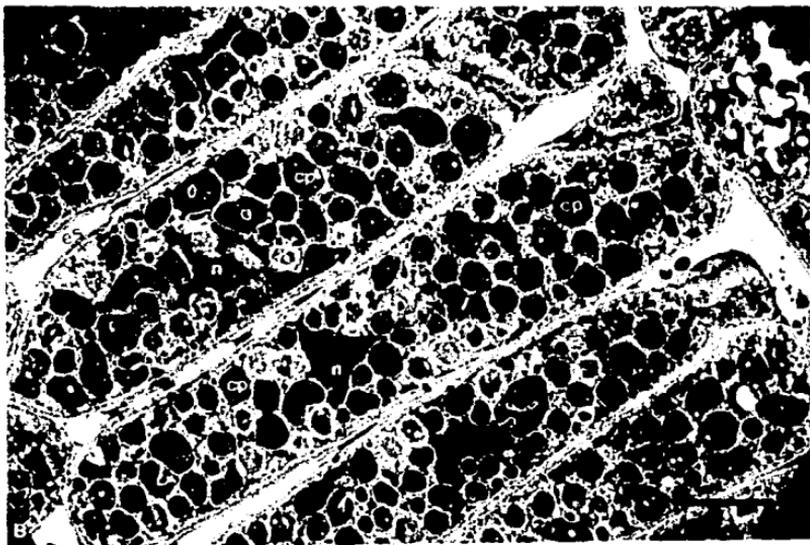
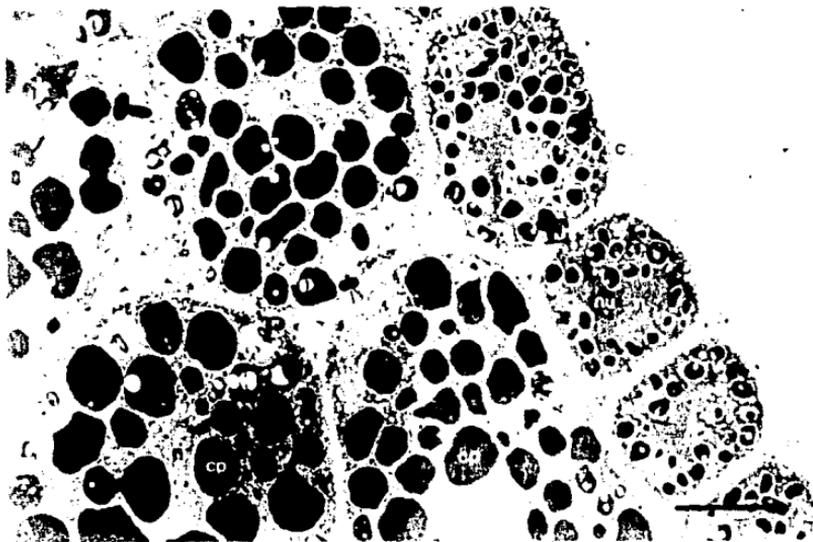
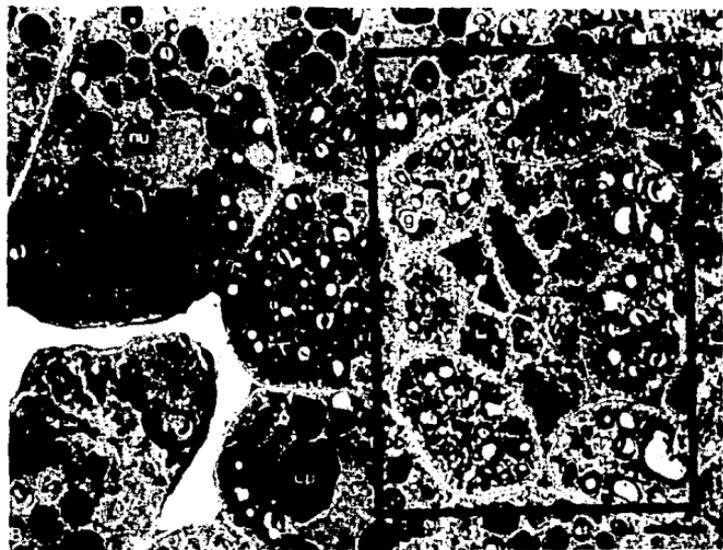
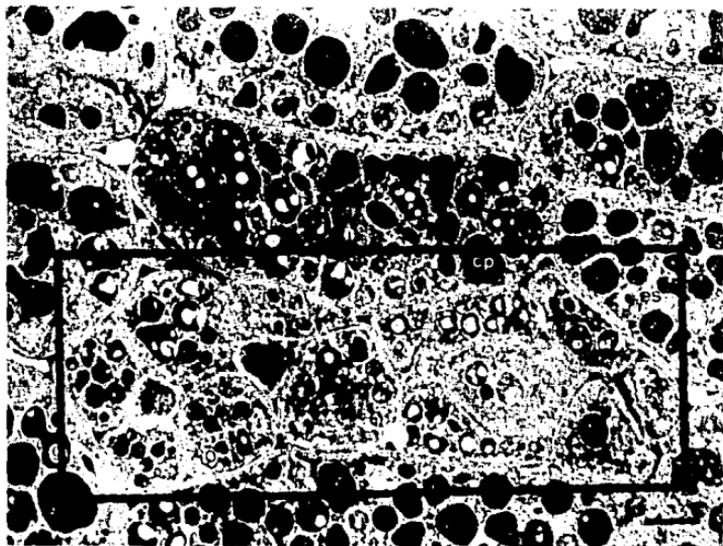


Figura 6.36

Detalles ultraestructurales de las células de cotiledón de embrión cigótico a los 60 días de desarrollo: Pared celular (pc), núcleo amebóide (n), cuerpos proteicos (cp), globoides (g), esferosomas (es), conjunto de células que podrían ser células del procambium (recuadro). Barra = 5 μ m



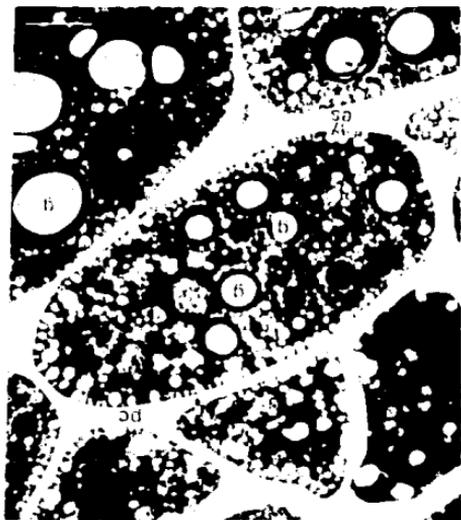


Figura 6.37

Ultraestructura de cotiledón de embrión cigótico a 60 días de desarrollo a diferentes aumentos donde se muestran: Esferosomas (es), cuerpos proteicos (cp) que en algunos casos contienen globoides (g)

Barra = 2 μ m

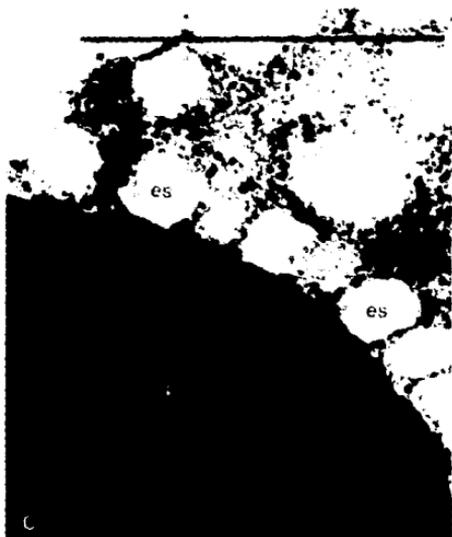
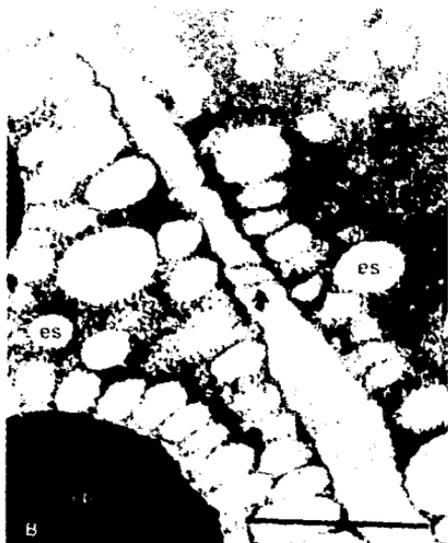


Figura 6.38

Diferentes acercamientos de los cuerpos proteicos (cp) en donde se puede observar su doble membrana (C), y la gran cantidad de esferosomas que los rodean, en algunos casos se observan plasmodesmos (flecha) aunque estos no fueron muy frecuentes.

Barra = 1 μ m

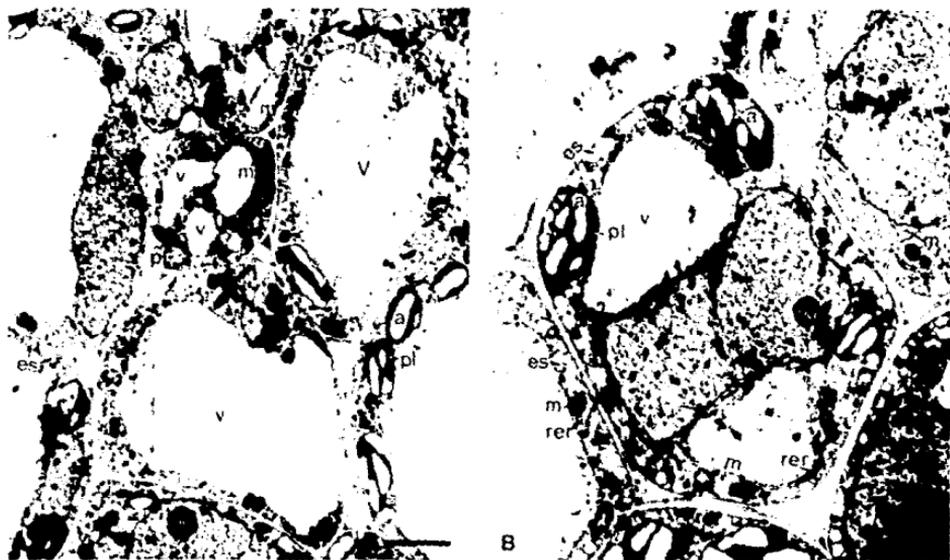


Figura 6.30

Detalles ultraestructurales de células de cotiledón de embrión somático a los 35 días de desarrollo: A) Vacuolas (v), plastos (pl) conteniendo hasta 5 granulos de almidón (a), mitocondrias (m), núcleo (n), nucleolo (nu). B) Vacuolas (v), núcleos grandes (n) con su doble membrana y nucleolos electrodensos (nu), mitocondrias (m), plastos (pl) con granulos de almidón (a), esferosomas poco abundantes (es), retículo endoplásmico rugoso (rer).

Barra = 2 μ m

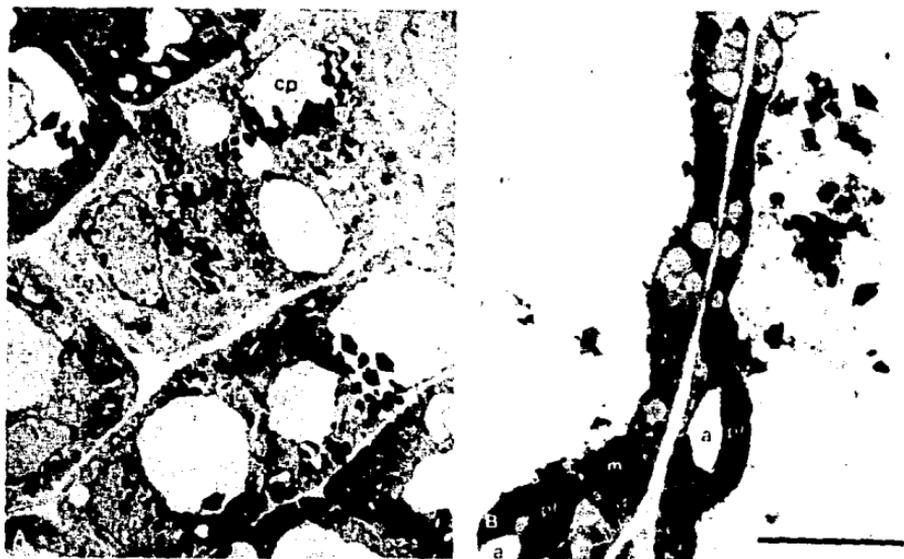


Figura 6.40

Ultraestructura de cotiledón de embrión somático a 35 días de desarrollo: A) cuerpos proteicos (cp) con cierto material electrodensó (flechas) aunque en su mayor parte se encuentran vacíos, plastos (pl) conteniendo varios granulos de almidón (a), mitocondrias (m). B) Esferosomas (es) menos abundantes que en el embrión cigótico, plastos (pl) con granulo de almidón (a), material electrodensó dentro de los cuerpos proteicos (flechas).

Barra = 2 μ m

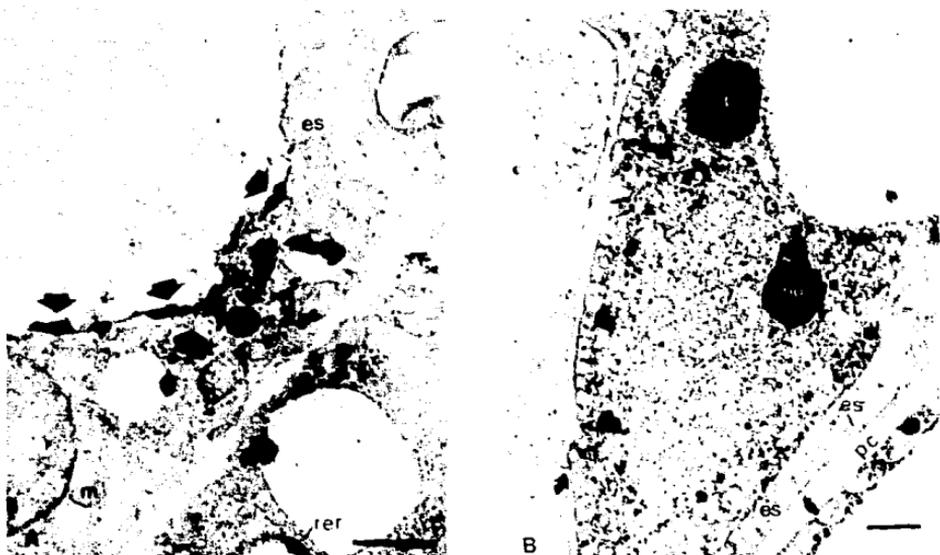


Figura 6.41

Detalles ultraestructurales de cotiledón de embrión somático a los 35 días de desarrollo: A) Cuerpos proteicos (Cp) conteniendo material electrodenso (flechas), mitocondrias (m), esferosomas (es), retículo endoplasmico rugoso (rer). B) Núcleo grande (n), nucleolo (nu) electrodenso con grumos de cromatina densa perinuclear adosada a la doble membrana, cuerpo proteico (Cp), mitocondria (m), esferosomas (es), plamodesmos (flecha).

Barra = 1 μ m

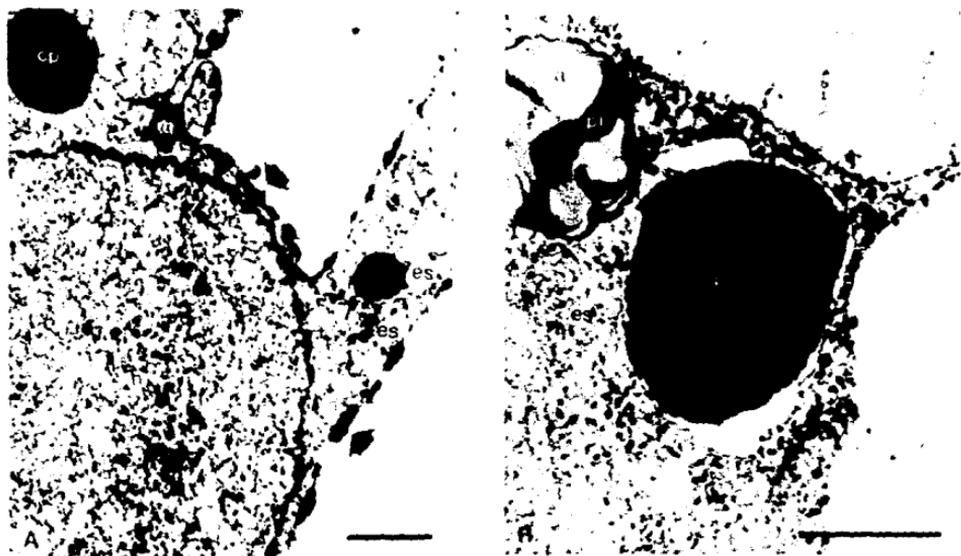


Figura 6.42

Ultraestructura de cotiledón de embrión somático a 35 días de desarrollo: A) Núcleo grande mostrando su doble membrana (n), material electrodenso adosado a la membrana del cuerpo proteico (flecha), cuerpo proteico (cp), mitocondria (m), plasto (pl), granulos de almidón (a), ribosomas (r) abundantes.

Barra = 1 μ m



Figura 8.43

Detalles ultraestructurales de cotiledón de embrión somático a 35 días de desarrollo: A) Dictiósoma (d) con 5 cisternas y vesículas secretoras, mitocondrias (m), plastos (pl) con granulos de almidón (a), esferosomas (es), ribosomas (r). B) Plastos (pl) con granulos de almidón (a), mitocondrias (m), esferosomas (es), ribosomas (r) muy abundantes. C) Pared celular (pc), ribosomas (r) abundantes lo que hace un citoplasma denso, mitocondrias (m), esferosomas (es), microtubulos (mt). Barra = 0.5 μ m



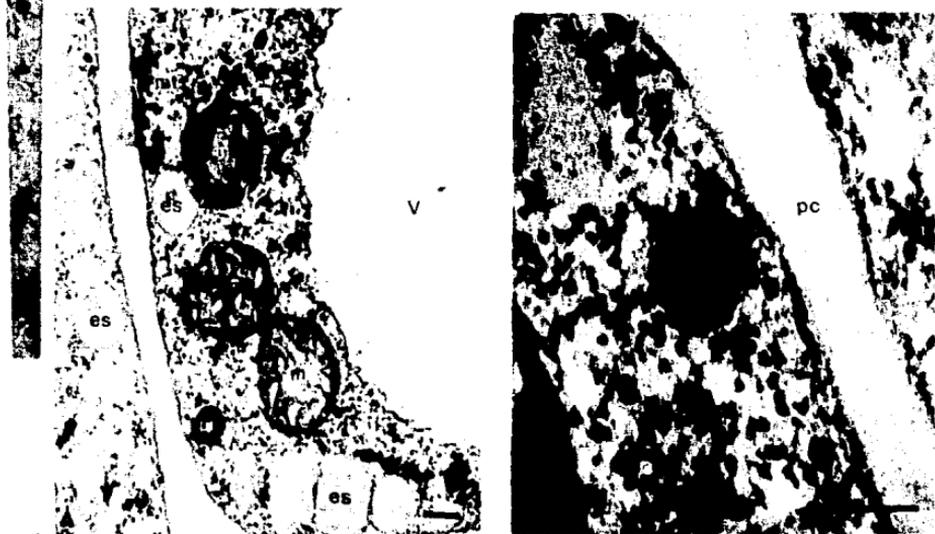


Figura 6.44

Cotiledón de embrión somático a los 35 días de desarrollo: A) Vacuola (v), mitocondrias (m) abundantes, esferosomas (es), retículo endoplásmico rugoso (rer), ribosomas (r) abundantes. B) Pared celular (pc), plasto (pl), y ribosomas (r). Barra = 0.2 μ m



Figura 6.45

Cortiledón de embrión somático a los 95 días de desarrollo: A) Dictiosoma (d) con 4 cisternas y vesículas secretoras, retículo endoplasmático rugoso (rer), ribosomas (r). B) Retículo endoplasmático rugoso (rer), ribosomas (r), microtúbulos (mt). C) Dictiosomas (d) con 4 cisternas, esferosomas (es), ribosomas (r), membrana nuclear. Barra = 0.5 μ m

De la misma manera que para las células de embriones cigóticos además de los cuerpos proteicos, se encuentran los esferosomas en el citoplasma, sin embargo, el número de estos es mucho menor que en las células del embrión cigótico.

Es posible también observar grandes núcleos con su doble membrana nuclear (Figs. 6.39 B, y 6.42 A), nucleolos electrodensos (Figs. 6.39 B y 6.41 B) con granulos de cromatina densa perinuclear adosada a la doble membrana.

Otro tipo de organelos que se presento frecuentemente fueron mitocondrias (Figs. 6.39 A y B, 6.40 A y B, 6.41 A y B, 6.42 B, 6.43 A, B y C, 6.44 A), plastos conteniendo granulos de almidón (Fig. 6.39 A y B, 6.43 A y B y 6.44 B,) y plasmodesmos (Figs. 6.39 B y 6.41 B), aunque estos dos últimos organelos no se presentaron de manera tan abundante como ocurre en el eje embrionario.

Un aspecto interesante es la gran cantidad de ribosomas y polirribosomas que le dan una apariencia muy densa al citoplasma (Figs. 6.42 A y B, 6.43 A, B y C, 6.44 A y B).

La frecuencia de ribosomas sugiere una síntesis activa de proteína, la cual puede ser necesaria para un rápido crecimiento celular (Hakman *et al.*, 1987).

Para el caso del eje embrionario y cotiledones de embriones somáticos de 42 días de desarrollo, los resultados del estudio microscópico se muestran en las figuras 6.46 - 6.49.

En las figuras 6.46 y 6.48, que corresponden a eje embrionario y cotiledón respectivamente, se puede observar cierta destrucción en las estructuras pues las células han tomado una forma muy irregular, diferente a la que se observaba en los embriones a los 35 días de desarrollo. Las células del eje embrionario (Figs. 6.46 y 6.47) practicamente pierden todo el citoplasma lo que sugiere una degradación del material de reserva acumulado en un bajo nivel en etapas tempranas, esto mismo se pudo observar para el caso del cotiledón (Figs. 6.48 y 6.49). Cabe mencionar que los embriones somáticos no entran en la fase de latencia, y que la germinación es un proceso continuo después de alcanzar cierta madurez, sin



Figura 6.46

Corte transversal de eje embrionario del embrión somático a los 42 días de desarrollo: A) Zona externa con células de parénquima con forma muy irregular, la vacuola ocupa casi la totalidad de la célula (v) y en algunas de estas células se pueden observar núcleos grandes (n) con nucleolo y algunos granulos de almidón (a). B) Zona interna con células muy irregulares pero con un citoplasma más denso que las células externas, son células poco vacuoladas y sin granulos de almidón. (Azul de toluidina). Barra = 50 μ m



Figura 6.47

Detalles ultraestructurales de células de eje embrionario del embrión somático a los 42 días de desarrollo: A) Cuerpos proteicos (Cp), retículo endoplásmico rugoso (rer), ribosomas (r). B) Cuerpos proteicos (Cp) y ribosomas (r). C) Dictiosomas (d) con 5 cisternas y vesículas de secreción, cuerpos proteicos (Cp) y ribosomas (r). Barra = 0.2 μ m



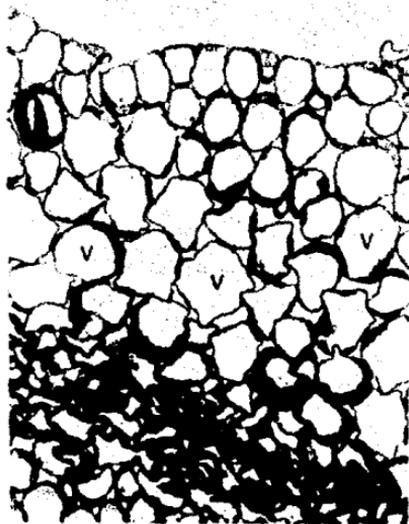


Figura 6.48

Corte transversal de cotiledon del embrión somático a los 42 días de desarrollo: Células de parenquima altamente vacuoladas de forma irregular pero en menor grado que el eje embrionario, en algunas células se observan núcleos grandes. (Azul de toluidina).

Barra = 50 μ m



Figura 6.49

Detalles ultraestructurales de células de cotiledón del embrión somático a 42 días de desarrollo: A) Células muy irregulares en donde se observan: Vacuolas (v), núcleos grandes (n), plastos (pl) y mitocondrias (m). B) Mitocondrias (m) y plastos (pl). C) Mitocondria con su doble membrana (m) y ribosomas (r) no muy abundantes.

Barra = 0.1 μ m



embargo, aun se pueden observar cuerpos proteicos, aunque estos están en un menor número (Figs. 6.47 y 6.49) y otros organelos que sugieren alta actividad metabólica, como mitocondrias (Fig. 6.49) y ribosomas (6.47).

En la literatura, existen algunas controversias con respecto a la formación de los cuerpos proteicos en semillas de leguminosas. Mientras algunos autores sugieren que los cuerpos proteicos descienden de una gran vacuola en donde son depositadas las proteínas de reserva y posteriormente esta vacuola es transformada a cuerpos proteicos por fragmentación, otros proponen que los cuerpos proteicos se originan del retículo endoplasmico rugoso e involucran al aparato de Golgi en el transporte de proteínas de reserva. Craig et al., 1980; Adler y M"ntz, 1983; Lending et al., 1988; Ericson et al., 1989; Gayler et al., 1989).

Con nuestro estudio no podemos saber exactamente cual es el origen de los cuerpos proteicos, sin embargo, la presencia de el retículo endoplasmico rugoso (Fig. 6.45 B, 6.47 A) y dictiosomas, los cuales presentan vesículas de secreción (Figs. 6.43 A, 6.45 A y C, 6.47 C) cerca de las vacuolas nos sugiere su posible participación en la génesis de los cuerpos proteicos así como en la síntesis y transporte de las proteínas de reserva.

En resumen, la apariencia del citoplasma de las células de los embriones somáticos en lo que se refiere a: pared celular, plasmodesmos, presencia de numerosos polisomas, dictiosomas asociados a vesículas secretatorias, numerosas mitocondrias y plastidios, etc., reflejan un alto nivel de actividad metabólica (Hakman et al., 1987). Mientras que la presencia de gran cantidad de material de reserva es típica de un embrión latente.

Singh 1977, estudió la estructura fina de embriones cigóticos latentes de *Medicago sativa* L y observó que, organelos tales como dictiosomas y vesículas secretatorias, retículo endoplasmico,

microtúbulos, polisomas, etc. están ausentes o reducidos. Habiendo presencia de plasmodesmos pero no se sabe si son funcionales dado el estado deshidratado del embrión. También reportó una pobre representación de retículo endoplásmico rugoso, que refleja la inactividad en la síntesis protéica en los embriones latentes. Las vacuolas típicas de células vegetales hidratadas, tampoco fueron observadas. Sin embargo los materiales de reserva se observaron en alta concentración en la forma de cuerpos lipídicos y cuerpos protéicos. El almidón en embriones sexuales latentes de alfalfa está exclusivamente contenido dentro de amiloplastos distribuidos en todo el embrión, pero con mayor concentración en la radícula (Hernandez P.V. 1989).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados anteriormente expuestos se pueden concluir algunas diferencias y semejanzas entre los embriones somáticos y cigóticos:

- 1.- Existe cierto paralelismo entre el desarrollo de embriones somáticos y cigóticos a nivel de su capacidad de germinación y desarrollo morfológico.
- 2.- A nivel bioquímico hay semejanzas en cuanto a la síntesis del mismo tipo de material de reserva por ambos grupos.
- 3.- No hay signos de latencia en los embriones somáticos a diferencia de los embriones cigóticos.
- 4.- Existen diferencias importantes en cuanto al grado de desarrollo de los cotiledones y también a la cantidad de material de reserva acumulada siendo muy pequeño en embriones somáticos y muy alto en embriones cigóticos.
- 5.- En los embriones somáticos la síntesis de proteína de reserva se detecta desde fases muy tempranas en el desarrollo pero su degradación también es bastante rápida.
- 6.- En los embriones cigóticos la síntesis de las proteínas de reserva comienza en una fase más tardía del desarrollo pero en este caso las proteínas son acumuladas.
- 7.- Los cotiledones de los embriones somáticos muestran muy escaso desarrollo comparados con el eje embrionario.

- 8.- En los embriones somáticos los cotiledones no siempre se encuentran separados a diferencia de los cotiledones de los embriones cigóticos.
- 9.- En embriones somáticos las células de los cotiledones son muy vacuoladas con gran cantidad de organelos, lo que las hace ser muy activas metabólicamente.
- 10.-En los embriones somáticos hay una mayor comunicación intercelular dada por un mayor número de plasmodesmos que en los embriones cigóticos.
- 11.-Los estudios realizados demuestran que las proteínas de reserva 7S y 11S son específicas de tejido, es decir, no se sintetizan en ningún otro órgano de la planta.
- 12.-Los estudios realizados también sugieren que las proteínas de reserva son también específicas del estado de desarrollo, es decir, se sintetizan durante la embriogénesis y en ningún otro momento durante el ciclo de vida de la planta, por lo tanto, se pueden considerar como buenos marcadores bioquímicos.

APENDICE A

Embriogénesis somática en alfalfa.
 Medio Bs (Gamborg et al., 1968) modificado por Villegas

Macronutrientes	mg/lit
NaH ₂ PO ₄ ● H ₂ O	150
MgSO ₄ ● 7H ₂ O	500
KNO	2528
Micronutrientes	
MnSO ₄ ● H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ ● 7H ₂ O	2
NaMoO ₄ ● 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄	0.025
CoCl ₂ ● 6H ₂ O	0.025
KI	0.75
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ● 7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Ac. Nicotínico	1
Tiamina-HCL	10
Piridoxina-HCL	1
Mio-inositol	100
Adenina	1
2,4-D	1
Kinetina	0.2

Medio MS (Murashige, T. and Skoog, F. 1962)

Macronutrientes	mg/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.
KH ₂ PO ₄	170.0
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	8.5
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.025
KI	0.88
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.025
NaMoO ₄ • 2H ₂ O	0.25
MnSO ₄ • H ₂ O	16.9
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ • 7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Glicina	2.0
Ac. nicotínico	0.5
(B ₆) piridixina HCl	0.5
(B ₁) tiamina HCl	1.0
myo-inositol	100

APENDICE B

Soluciones utilizadas para la extracción y separación de las proteínas de reserva

AMORTIGUADOR

Fosfatos 50mM.....Sodio dibásico 50mM, fosfato de sodio monobásico 50mM, PMSF 200 μ m y EDTA 10mM

Fosfatos salino.....Amortiguador de fosfatos + NaCl 1M
50 mM

Acetatos 50 mM.....Acetato de sodio 50mM, + ac. acético glacial 50mM, hasta pH 4.75, PMSF 200 μ m EDTA 10 μ m y NaCl 1M.

APENDICE C

Soluciones para geles de poli(acrilamida)-SDS

Tris 1M.....12 gr. para 100ml de agua, ajustar pH 6.8

Tris 3M.....36 gr. para 100ml de agua, ajustar pH 6.8

Acrilamida:Bis.....30 gr. de acrilamida y 0.8 gr. de bisacrilamida para 100 ml de agua.

Amortiguador de6.25 ml de Tris 1M pH 6.8, 1ml de azul de muestra 4X
bromofenol 0.1%, 2 gr. de SDS y aforar a 25ml con glicerol.

Adicionar el β -mercapto etanol antes de cargar la muestra (2 μ l/100 μ l de amortiguador 4X)

Amortiguador de.....Tris-base 30.2 gr, glicina 144 gr, SDS al corrida 10X 1%, pH 8.4. para 1 litro.

Fijador y colorante....Metanol 50%, ac. acético glacial 10% , azul de coomassie 0.25% y agua destilada.

Solución desnaturalizadora....Metanol 40%, ac. acético glacial 10% y agua 50%.

APENDICE D

Soluciones para inmunización de conejos y la técnica de ELISA

PBS.....	2.7 ml de KCl 1M, 1.5 ml de KH_2PO_4 1M, 27.4 ml de NaCl 5M. y 18.2 ml de Na_2HPO_4 0.5M para llevar a un litro.
PBS-T.....	PBS + Tween 20 al 0.05%.
Solución bloqueadora....	Glicina al 5% en PBS-T
Sustrato.....	12.5 ml de ABTS, 25 ml de CPB pH5 y 12.5 μl de H_2O_2 al 6%.

APENDICE E

Soluciones para transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa e inmunodetección.

Regulador alterno.....	Tris 48mM, Glicina 30mM, SDS 1.3 mM, (para transferencia) metanol al 20%, pH 9.2.
TBS 5X.....	Tris base 100mM, NaCl 2.5M y ajustar el pH a 7.5.
TBS 1X.....	0.5 ml de Tween 20 por litro de TBS 1X
Solución de bloqueo.....	BSA al 1% en TBS
Amortiguador de.....	BSA al 1% en TTBS anticuerpo
Sustrato.....	30 mg de 4Cl- α naftol en 10 ml de metanol frío, mezclar con 50 ml de TBS y adicionar 150 μl de H_2O_2 al 6%.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adler, K. and Müntzã K. (1983), Origen and development of protein bodies in cotyledons of *Vicia faba*. *Planta* 157: 401-410.
- 2.- Ashton, F. M. (1978). Mobilization of storage protein of seeds. *Ann. Rev. Plant. Physiol* 27:95-117.
- 3.- Auhors, D.K., *et al* (1985), Post harvest biotechnology of food legumes. CRC Press, Inc. Florida 180 p.
- 4.- Baumgarther, B.; Tokuyasu, K. T. and Chrispeels, M. J. (1978). Localization of vicilin peptohidrolase in the cotyledons of mungbean seedling by immunofluorescence microscopy. *J. Cell. Biology* 79:10-19.
- 5.- Baumgarther, B.; Toukusu, K. T. and Chrispeels, M.J. (1980). Immunocytochemical localization of reserve protein in the endoplasmic reticulum of developing bean *Phaseolus vulgaris* cotyledons. *Planta* 150: 419-425.
- 6.- Benacerraf, B. and Unanue, E.R. (1979). Textbook of Immunology The Williams Wilkins Company Baltimore 298 p.
- 7.- Bergfeld, R.; Kühnl, T. and Schopfer P. (1980). Formation of protein storag bodies during embryogenesis in cotyledons of *Sinapis alba* L. (1980). *Planta* 148: 145-156.
- 8.- Bohdanowicz, J. (1987). *Alisma* embryogenesis: the development and ultrastructure of de suspensor
- 9.- Bollini, R. and Crispeel, M. (1979). The rough endoplasmic reticulum in the site of the reserve-protein synthesis in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. *Planta* 45: 487-501.
- 10.- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of macrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals Biochem.* 72: 248-254.
- 11.- Briarty, L.G.; Coult, D.A. and Boulter, D. (1970). Protein bodies of germinating seeds of *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany.* 21(57): 513-524.

12. - Capra, D. (1977). El lado de unión de los anticuerpos. En: *Inmunología. Libros de investigación y Ciencia. Scientific American*. Ed. Labor, S.A. Barcelona. pp 62-74.
13. - Catty, D. (1988). *Antibodies Volume I A practical approach*. Irl Press. Oxford. Washington D.C. 203 p.
14. - Chrispeels, M.J. and Boulter, D. (1975). Control and storage protein metabolism in the cotyledons of germination Mung bean: Role of endopeptidase. *Plant Physiol* 55:1030-1037.
15. - Chrispeels, M.J.; Baumgarther, B. and Harris, N. (1976). Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73(9): 3168-3172.
16. - Chrispeels, M.J. (1980/81). The role of the endoplasmic reticulum in the mobilization of reserve macromolecules during seedling growth. *Israel Journal of Botany*. 29:225-245.
17. - Chrispeels, M.J.; Higgins, T.J.V.; Craig, S. and Spenser D. (1982 a). Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetic of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons. *The Journal of Cell Biology* 93:5-14.
18. - Chrispeels, M.J.; Higgins, T.J.V. and Spencer, D. (1982 b). Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processin of the polipeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *The Journal of Cell Biology*. 93:306-313.
19. - Chrispeels, M.J. (1984). Biosynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 304: 309-322.
20. - Cleave, B.V.; Clausen, S. and Sauter J.J. (1988). Immunochemical localization of storage protein in poplar wood. *J. Plant Physiol* 133:371-374.
21. - Cohn, N.S. and Mitchel, J.P. (1986). Immunocytochemical localization of protein in diferentiating tissues of *Pisum sativum*. *Histochemistry* 84:432-438.

- 22.- Craig, S.; Goodchild, D.J. and Hardham, A.R. (1979). Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. I Qualitative and Quantitative Changes in Parenchima Cell Vacuoles. Aust. J. Plant. Physiol. 6: 81-98.
- 23.- Craig, S.; Goodchild, D.J. and Miller C. (1980). Structural aspect on protein accumulation in developing pea cotyledons II Three-dimensional reconstructions of vacuoles and protein bodies from serial sections. Aust. J. Plant. Physiol. 7:329-337.
- 24.- Craig, S.; Miller A. and Goodchild D.J. (1980). Structural aspect of protein accumulation in developing pea cotyledons. III Immunocytochemical localization of legumin and vicilin using antibodies shown to be specific by the enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Aust. J. Plant Physiol. 7:339-351.
- 25.- Craig, S. and Goodchild, D.J. (1984 a). Golgi-mediated vicilin accumulation in pea cotyledon cell is re-directed by monensin and regericin. Protoplasma 122:91-97.
- 26.- Craig, S. and Goodchild, D.J. (1984 b). Periodate-acid treatment of sections permit on-grid immunogold localization of pea seed vicilin in E.R. an Golgi. Protoplasma 122:35-44.
- 27.- Croissant, S. Y. and Bopp, M. (1988). Formation and degradation of storage proteins in the embryo of *Sinapis alba*. Journal Plant Physiol 32:520-528.
- 28.- Crouch, M.L. and Sussex, I.M. (1981). Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. Planta 153:64-74.
- 29.- Crouch, M.L. (1982). Non-zygoty embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. Planta 158:520-524.
- 30.- Croy R.D., Gatehouse J.A., Evans I.M. and Boulter D. (1980 a) Characterisation of the storage protein subunits synthesis in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (*Pisum sativum* L). 1.-Legumin. Planta 148:49-56.

31. - Croy, R.D. et al (1980 b). Characterisation of the storage protein subunitis synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (*Pisum sativum* L) II. Vicilin. *Planta* 148:57-63.
32. - Cunnigham, A. J. (1978). *Understan Immunology*. Academic Press, INC, London LTD 254 p.
33. - DeLise, A.J. and Crouch, M.L. (1989). Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 91:617-623.
34. - Derbyshire, E.; Wright, D.J. and Boulter D. (1978). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seed. *Phytochemistry* 15:3-24.
35. - Dixon, R.A. (1985) *Plant cell culture practical approach*. IRL Press Oxford Washington D.C. 236 p.
36. - Dodds, J.H. and Robert, L.W. (1982). *Experiments in plants Tissue Culture*. Cambridge University Press. USA. 178 p.
37. - Dos Santos A.V.P., Cutter E.G. and Davey M.R. (1983). Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Protoplasma* 117:107-115.
38. - Durantti, M.; Onder, M.J. and Lord J.M. (1989). Different rates for integral ptoein insertion in to *Ricinus communis* protein-body and glyoxisome membranas. *Planta* 179:331-339
39. - Dure, L.S. (1975). *Seed formation*. *Ann Rev. Plant Physiol.* 26:299-78.
40. - Ericson M.L., Ródin J., Rodriguez-Martínez H., Plóen L. and Rask L. (1989). An immunocytochemical localization of the *Brassica napus* storage protein napin in developing seed embryos. *European Journal of Cell Biology* 49:213-217.
41. - Fischer W., Bergfeld R. and Shoepfer. (1987). Induction of storage protein synthesis in embryos of mature plants seeds. *Naturwissenschaften*. 74(2):86-88.
42. - Fowke, L.C. (1984). *Preparation of cultured cell and tissues for transmission electron microscopy*. *Cell. Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*, Vol. 1 Academic Press Inc.

43. - Fudenberg H.H., et al (1982). *Inmunologia clinica*. Ed. El manual moderno, Mexico, D.F. 824 p.
44. - Gayler K.R. Wachsmann F., Kolivas S., Nott R. and Johnson E.D. (1989). Isolation and characterization of protein bodies on *Lupinus angustifolius*. *Plant Physiol.* 91: 1425-1431.
45. - Guia para la asistencia técnica agrícola SARH, INIA, 1985.
46. - Gershoni, J.M. and Palade G.E. (1983). Protein blotting principles and application. *Analytical Biochemistry* 131:1-15.
47. - Greenwood, J.S. and Chrispeels, M.J. (1985). Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the endoplasmic reticulum and Golgi complex of developing bean cotyledons. *Planta* 164: 295-302.
48. - Greenwood, J.S.; Stinissen, H.M.; Peumans W.J. and Chrispeels M.J. (1986). *Sambucus nigra* agglutinin is localized in protein bodies in the phloem parenchima of the bark. *Planta* 167: 275-278.
49. - Hakman, I.; Rennie P. and Fowke L. (1987). A light and electron microscope study of picea glauca (white spruce), somatic embryos. *Protoplasma* 140:100-109.
50. - Halpin, C.; Conder, M.J. and Lord J.M. (1989). Different rates for integral protein insertion into *Ricinus communis* protein-body and glyoxysome membranes. *Planta* 179:331-339.
51. - Halperin, W. and Jensen, W.A. (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastructure Res* 18:428-443.
52. - Hanson, C.H. (1972). *Ciencia y tecnología de la alfalfa*. Tomo I. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. S.R.L. Impreso en R.O. de Uruguay 432 p.
53. - Hanson, C.H. (1972). *Ciencia y tecnología de la alfalfa*. Tomo II. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. S.R.L. Impreso en R.O. de Uruguay, 433-973 p.
54. - Harley, S.M. and Beevers, L. (1989). Coated vesicles are involved in the transport of storage protein during seed

- development in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* 91:674-678.
55. - Herman, E.M. (1988). Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39:139-155.
56. - Hernandez, P.V. (1989). Morfología y citoquímica de la ontogenia de los embriones somáticos de *Medicago sativa* L. var. A.70.34. Tesis profesional U.N.A.M., E.N.E.P., Unidad Zaragoza, México. D.F. 173 p.
57. - Higgs, T.J.V. (1984). Synthesis and regulation of major protein in seeds. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35:191-221.
58. - Hughes, H.D. et al (1978). Forrajes. La ciencia de la agricultura basada en la producción de pastos. C.E.C.S.A., México, D.F. 758 p.
59. - Hurtado, M.D. y Merino, M.M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México, D.F. 232 p.
60. - Ihle, J.N. and Dure, L.S. (1972). The developing biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. *The Journal of Biological Chemistry.* 247(16):5048-5055.
61. - Jensen, W.A. and Salisbury F.B. (1984). Botany Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont California, 699 p.
62. - Johnstone, A. (1987) *Immunochemistry in practice.* Blackwell Scientific Publications. Oxford Great Britain. Kim W.T. et al (1988). Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 175: 173-182.
63. - Kim T.W., Franceschi V.R., Krishnan H.B. and Okita T.W. (1988). Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 175: 173-182.
64. - Knox, R.B. (1982). Methods for localizing and identifying antigens in plant tissue. In *techniques in Immunocytochemistry*, Vol. I. Ed by C.R. Bullock and Petrusz Academic Press pp 205-238.
65. - Krishnan, H.B., Franceschi, V.R. and Okita T.W. (1986). Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein-body formation in rice seed. *Planta* 169:471-480.

66. - Kronchko, J.E. and Bewley, J.D. (1988). Use of electrophoretic techniques in determining the composition of seed storage protein in alfalfa. *Electrophoresis*. 9(11):751-
67. - Kung, S.D. (1985). Fraction-1 Protein Chloroplast DNA as Genetic Marker en Evans D.A., Sharp W.R., Amurato P.V. y Yamada Y. (1985). Hand book of plant cell culture. V. I. Techniques for propagation and Breeding. Macmillan Publishing Company New York, Academic Press pp. 583-606.
68. - Laguna, H.G. (1991). Comunicación personal.
69. - Leder, P. (1982). Bases Genéticas de la diversidad de anticuerpos. En: *Inmunología. Libros de investigación y ciencia*. Scientific American. Ed. Labor, S.A. Barcelona. pp. 62-74.
70. - Lefkovits, I. and Bervenuto, P. (1979). *Immunological methods*. Academic Press, Inc. (London) LTD pp. 81-105.
71. - LeGal, M.F. and Roy, L. (1986). The reserve protein in the cells of mature cotyledons of *Lupinus alba* var. Lucky. I. Qualitative ultrastructural study of the protein bodies *Protoplasma* 130:120-127.
72. - Lending C.R., Kriz A.L., Larkins B.A. and Bracker C.E. (1988). Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zeins. *Protoplasma*. 143:51-62.
73. - Lending C.R., Chesnut R.S., Shaw K.L. and Larkins B.A. (1989). Immunolocalization of avenin and globulin storage protein in developing endosperm of *Avena sativa* L. *Planta* 187: 315-324.
74. - Luthe, D.S. (1987). Storage protein synthesis during Oat (*Avena sativa* L.) seed development. *Plant. Physiol.* 84: 337-340.
75. - Mosee, J. and Fernollet, J.C. (19) Storage proteins of legumeseed. In: *Chemistry, Biosynthesis of legumes*. Ed. by S.K. Arora. Oxford IBH Publishing pp. 111-171.
76. - Murashige, T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays whit tabaco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.

77. - Murray, D.R. (1984a). Seed Physiology Vol. 1. Development. Academic Press Australia 279 p.
78. - Murray, D.R. (1984 b). Seed Physiology. Vol.2. Germination and reserve mobilization. Academic Press Austria 295 p.
79. - Nieden, Uta zur and Neumann D. (1982). Electron microscopical immunocytochemical localization of storage protein in *vicia faba* seeds. European Journal of Cell Biology. 26: 268-233.
80. - Nieden, Uta zur (1984). Dictyosomes participate in the intracellular pathway of storage proteins in developing *Vicia faba* cotyledons. European Journal of Cell Biology 34:9-17.
81. - Nielsen, S.S. et al (1988). Comparative Digestibility of legume storage proteins. J. Agric. Food. Chem 36:896-902.
82. - Ortiz, O.L. (1987). Inmunología. Ed. Interamericana, México, D.F. 251 p.
83. - Peña, C.G. (1988). Encapsulación de embriones somáticos obtenidos *in vitro*. Tesis profesional. U.N.A.M., E.N.E.P. Unidad Zaragoza. México, D.F. 178 p.
84. - Pernollet, J.C. (1978). Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. Phytochemistry. 17:1473-1480.
85. - Pernollet, J.C. and Mosse, J. (1983). Structure and localization of legume and cereal seed storage proteins. In: Seed proteins. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe numer 20. Ed. by J. Doussant, J. Mosse and J. Vaughan. Academic. Press London 335 p.
86. - Raghavan, V. (1976). Experimental embryogenesis in vascular plants New York Academic Press.
87. - Robards, A.W. (1970). Electron microscopy and plant ultrastructure. Mc Graw-Hill. London 298 p.
88. - Robert, M.L. y Loyola V.M.(1985). El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatan. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
89. - Roitt, I.M. et al (1987). Immunology. The C.V. Mosby Company L.t.d. St. Louis, Missur

- 90.- Sauter, J.J. and van Clave B. (1988). Protein bodies in ray cell of *Populus X canadensis* Moench robusta. *Planta* 173: 31-34.
- 91.- Sauter, J.J. and Cleve, B.V. (1989). Immunochemical localization of a willow storage protein with a poplar storage protein antibody. *Protoplasma* 149:175-177.
- 92.- Savelberch, R. and Parij, R.V. (1971). Ultrastructural study of protein body formation in reaping seeds of *Pisum sativum* L. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 79:1040-1.
- 93.- Shoemaker, R.C.; Chritofferson, S.E.; and Galbraith D.W. (1987). Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 6:12-15.
- 94.- Shutov, A.D. and Vaintraub, I.A. (1987). Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*. 26(6):1557-1566.
- 95.- Staswick, P.E. (1989). Preferential loss of an abundant storage protein from soybean pods during seed development. *Plant Physiol.* 90:1252-1255.
- 96.- Street, H.E. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture. In: *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press. London and New York pp 71-101.
- 97.- Street, H.E. (1977). *Plant tissue and cell culture botanical monographs*. Volume II. Blackwell Scientific. Publications. Oxford. 814 p.
- 98.- Stuart, D.A.; Nelsen, J.; Strickland, S.G. and Nichol, J.W. (1985). Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. In *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Ed by Randolph R. Henke. Pleum Publ. Corp. pp 59-73.
- 99.- Stuart, D.A. and Nelsen, J. (1988 a). Isolation and characterization of alfalfa 7S and 11S seed storage protein. *J. Plant Physiol.* 132:129-133.
- 100.- Stuart D.A., Nelsen J. and Nichol J.W. (1988 b). Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage protein in somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 132:134-139.

- 101.-Sun S.M., Mutschler M.A., Bliss F.A. and Hall T.C. (1978). Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. *Plant Physiol* 81:918-923.
- 102.-Towbin H., Staenelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9):4350-4354.
- 103.-Tulloch, P.A. and Blagrove R.J. (1985). Electron microscopy of seed-storage globulins. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 24(2):521-532.
- 104.-Vigil, E.L. et al (1985). Structural changes in protein bodies of cotton radicles during seed maturation and germination. In: *Botanical Microscopy* Oxford University Press 368 p.
- 105.-Villegas, T.L.(1966). Developmental study of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Depart of Biology University of Ottawa* 27 p.
- 106.-Webster, B.D. and Leopold A.C. (1977). The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. *Amer. J. Bot.*; 64(10):1286-1293.
- 107.-Wilson, C.L. and Loomis W.E. (1980). *Botanica. Unión Topografica. Ed. Hispano-Americana, S.A. México* 682 p.
- 108.-Wright, D.J. and Bumstead, M.R. (1984). Legume proteins in food technology. *Phil Trans R. Soc. Lond.* 304 p.