



**CONACYT**

26 de abril de 2001  
Oficio No. C100/


M.C. IGNACIO RODRIGO ISLAS FLORES  
CICY  
KM 7 ANTIGUA CARRETERA A PROGRESO  
EX-HDA XCUMPICH S/N CORDEMEX  
97310 MERIDA, YUC.

Ref. 0014P - N9506

**CARACTERIZACION HISTOLOGICA Y BIOQUIMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRION CIGOTICO DE COCOTERO COCOS NUCIFERA (L.)**

Por este conducto, hago de su conocimiento que el comité de CIENCIAS NATURALES revisó el Informe Técnico del proyecto arriba citado. Adjunto a la presente envío copia del dictamen con las observaciones del Comité.

Atentamente.

  
**DR. HERSCH DAWID GOLDBARD DEUT**  
Secretario Técnico de la D.A.I.C.

C.c.p. Lic. Xavier Santaella Roman. Coordinador Ejecutivo de Informes.  
C.c.p. expediente.

\*MBM/xsr

Mérida Yuc., a 17 de marzo de 1999.

**DGI029/99**

DR. VICTOR MANUEL LOYOLA VARGAS.  
DIRECTOR ACADEMICO, CICY  
PRESENTE

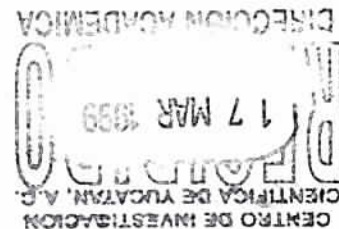
Estimado Dr. Loyola:

Anexo a la presente informe final del proyecto "**CARACTERIZACION HISTOLOGICA Y BIOQUIMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRION COGOTICO DEL COCOTERO** (*Cocos nucifera L.*)" que deberá anexarse al historial del Centro.

Sin otro particular, le envío un saludo cordial.

ATENTAMENTE

  
A. Larcque Saavedra  
Director General



CONACYT, DIRECCION ADJUNTA DE INVESTIGACION CIENTIFICA  
CONCENTRADO DE INFORME TECNICO FINAL DE PROYECTOS DE  
INVESTIGACION

---

**DATOS GENERALES**

CLAVE 0014P-N

**TITULO DEL PROYECTO:**

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRIÓN CIGÓTICO DE COCOTERO *Cocos nucifera* (L).

**RESPONSABLE**

IGNACIO RODRIGO ISLAS FLORES

**INSTITUCIÓN**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.

**DIRECCIÓN COMPLETA**

CALLE 43 No. 130, COLONIA CHUBURNA DE HIDALGO, C. P. 97200, MÉRIDA YUCATÁN, MÉXICO.

C.P. 97200 CIUDAD: MÉRIDA ENTIDAD: YUCATÁN TELÉFONO: (0199) 81 39 66

**CORREO ELECTRÓNICO:** resflo@cicy.cicy.mx

**INFORME:** FINAL

**PERÍODO QUE CUBRE ESTE INFORME:** ABRIL DE 1996 A ABRIL DE 1998.

**FECHA DE INICIO:** ABRIL DE 1996      **DURACIÓN:** 2 AÑOS

**FINANCIAMIENTO OTORGADO PARA TODO EL PERÍODO CUBIERTO:**

**GASTO CORRIENTE:** \$ 79,000.00      **EJERCIDO:** \$ 47,242.18

**GASTO DE INVERSIÓN:** \$ 70,000      **EJERCIDO:** \$ 36,752.81

**EVALUACIONES DE INFORMES PARCIALES ANTERIORES:**

**NUMERO DE INFORMES ENTREGADOS:** 1

**EVALUACIONES:** BUENO

**PERSONAL QUE PARTICIPA EN EL PROYECTO**

DRA. TERESA HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR

DR. CARLOS ORPEZA SALIN

---

---

## **CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS DURANTE EL PERIODO DE VIGENCIA**

### **OBJETIVOS Y METAS INICIALES**

- 1.- Determinar el patrón de desarrollo histológico del embrión cigótico de cocotero.
- 2.- Caracterizar el patrón general de fosforilación durante los distintos estadios de desarrollo del embrión cigótico de cocotero.
- 3.- Determinar si la actividad de las proteínas cinasas varían en los diferentes estadios de desarrollo del embrión cigótico de cocotero.
- 4.- Determinar que proteínas se fosforilan específicamente en tirosina durante el desarrollo del embrión cigótico
- 5.- Determinar si existe alguna proteína que se fosforile específicamente en tirosina y que pudiera ser utilizada como marcadora de tejidos de cocotero con potencial embriogénico.
- 6.- Caracterizar a través de ensayos *in vitro* la respuesta de las proteínas cinasas a los fitorreguladores ácido abscisico (ABA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), citocininas, etileno y giberelinas.
- 7.- Implementar la técnica de hidrólisis alcalina con el fin de apoyar los resultados obtenidos en los inmunoblots contra fosfotirosina.
8. Realizar la separación de fosfoaminoácidos con el objetivo de confirmar la presencia de fosfotirosina en algunas proteínas de cocotero.

## **METAS.**

1.- Demostrar que la fosforilación en tirosina es parte del proceso embriogénico en plantas.

C.M. Cuando por medio de Western Blot se obtengan evidencias de que la fosforilación en tirosina es un proceso que ocurre en los embriones cigóticos de cocotero.

2.- Formación de recursos humanos a nivel de Doctorado.

C.M. Cuando un estudiante de Doctorado someta su tesis de grado a revisión con su comité tutorial.

3.- Publicación de los resultados en revistas internacionales con alto impacto.

C.M. Cuando se tenga un artículo publicado y otro sometido a revisión.

## **LOGRADOS:**

Los objetivos 1, 2, 3, 4 Y 5 han sido cubiertos en su totalidad. Una parte de los resultados se publicaron en la revista de Plant Physiology (1998) 118:257-263 (ver anexo ). Otra parte de resultados esta incluida en el capítulo 6 de la tesis de Doctorado de Ignacio Rodrigo Islas Flores. Como tejidos con potencial embriogénico se utilizó a tejidos de cocotero que estaban siendo cultivados *in vitro*, en un medio que induce la embriogenesis somática en esta especie (Chan J. L, Saenz L., Talavera C et al., 1998). El cuadro 1 resume los resultados obtenidos en este estudio y fue publicado en la tesis de Doctorado de Ignacio Rodrigo Islas Flores. Además, con los resultados obtenidos a partir de los tejidos de cocotero cultivados *in vitro*, se elaboró y sometió un artículo a la revista de Plant and Cell Physiology (se anexa carta de envío y carta de acuse de recibo).

Del objetivo 6 no se cubrió más que el 5%. Esto se debió a que en el segundo año del proyecto se inicio la búsqueda y caracterización de las proteínas fosforiladas en tirosina que pudieran funcionar como marcadoras de potencial embriogénico en los

tejidos de cocotero. No obstante, los resultados que se obtuvieron en el objetivo 6 fueron presentados en el XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, donde después de ser presentados en sesión oral, fueron premiados con la beca Socios Fundadores; premio otorgado por la misma Sociedad (Ver anexo)

Los objetivos 7 y 8 se cubrieron en su totalidad. Los resultados obtenidos fueron incluidos en el artículo publicado en la revista de Plant Physiology (1998), 118: 257-263, en el artículo sometido a la revista de Plant and Cell Physiology y en la tesis de Doctorado de Ignacio Rodrigo Islas Flores.

### **METAS LOGRADAS.**

1.- Por medio de Western Blot se demostró que existen proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en los embriones cigóticos y tejidos de cocotero cultivados *in vitro*. El proceso es de tipo dinámico y parece correlacionar con la capacidad embriogénica de los tejidos (mayor cantidad de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en embriones cigóticos y tejidos de cocotero en etapas tempranas de la embriogénesis). Por esta razón se sugiere una correlación entre ambos eventos (ver cuadro 1).

2.- Se graduó el estudiante de Doctorado Ignacio Rodrigo Islas Flores (Ver anexo).

3.- Se publicó un artículo en la revista de Plant Physiology (1998) 118: 257-263 y se tiene sometido un segundo artículo a la revista Plant and Cell Physiology (ver anexo).

---

---

## PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE TODO EL PROYECTO

**LIBROS: NACIONALES** Terminados-- En proceso-- **EN EL EXTRANJERO** Terminados-- En proceso --

**ARTÍCULOS: NACIONALES** Terminados-- **EN EL EXTRANJERO** Terminados **1**  
en proceso en proceso **1**

**TESIS LICENCIATURA** Terminadas En proceso **COLOQUIOS Y CONGRESOS**

**MAESTRÍA** Terminadas En proceso Ponencias presentadas **3**

**DOCTORADO** Terminadas **1** En proceso Organizados

### **OTROS**

Este trabajo también recibió financiamiento parcial de FIRCA (R03TW002263) y de la Comunidad Económica Europea (ERBTS3\* CT940298).

## RESUMEN DEL FORTALECIMIENTO A LA INFRAESTRUCTURA EN LA INSTITUCION Y COMENTARIOS GENERALES SOBRE EL INFORME Y LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.

### **EQUIPO COMPRADO (Recibido)**

- 1 Equipo de electroforesis Hoefer (descripción de cada una de sus partes)
- a) 1 Tapa con cables de conexión, cat. SE5056, Hoefer
  - b) 1 Cámara de buffer (inferior), cat. SE6150, Hoefer
  - c) 1 Cámara de buffer (superior), cat. SE6054, Hoefer
  - d) 1 Peine para 15 pocetas de 1.5 mm, cat. SA511-15-1.5, Hoefer
  - e) 2 Juntas selladoras para acoplar los tanques alto y bajo, cat SE6005L Hoefer
  - f) 2 Espaciadores de 2 cm por 16 cm x 1, cat. SE6119-2-1,5, Hoefer
  - g) 2 Pinzas de ensamblaje 50-3nmG, cat. SE6003, Hoefer
  - h) 6 Piezas de cristal 18x16, cat. SE6102, Hoefer

1 Equipo de transferencia Hoeffler (descripción de cada una de sus partes).

- a) 1 Unidad de transferencia, cat. SE42, Hoefer
- b) 1 Intercambiador de calor (refrigerante), SE 6160, Hoefer
- c) 2 Abrazaderas para transferir geles, cat. SE6015, Hoefer

1 Paquete de micropipetas Labsystems (incluye)

a) 1 Micropipeta digital finnepipette de 0.2-2  $\mu\text{L}$

b) 1 Micropipeta digital finnepipette de 1.5-10  $\mu\text{L}$

c) 1 Micropipeta digital finnepipette de 5-40  $\mu\text{L}$

d) 1 Micropipeta digital finnepipette de 40-200  $\mu\text{L}$

e) 1 Micropipeta digital finnepipette de 200-1000  $\mu\text{L}$

---

---

---

---

**EVALUACIÓN DEL INFORME FINAL POR EL COMITE**

EXCELENTE----- BUENO----- ACEPTABLE-----

NO SE ACEPTA----- PENDIENTE-----

**COMENTARIOS DEL COMITE**

---

---



## CUESTIONARIO

### I.- Datos generales:

Nombre completo del responsable: IGNACIO RODRIGO ISLAS FLORES

R. F. C. del responsable: IAFI630313 Area del proyecto: CIENCIAS NATURALES

Institución: CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN Clave del proyecto: 0014P-N

Fecha de inicio (mes/año) 04/1996 Fecha de término (mes/año) 05/1998

Situación actual del proyecto: en proceso ( ) terminado ( X )

II.- Artículos publicados en (anexe relación): indique número

- a) Revistas con arbitraje 1
- b) Revistas sin arbitraje
- c) Memorias en extenso de congreso

III.- Trabajos presentados en congreso (indique número):

- a) Internacionales 2 no. de personas 4
- b) Nacionales 1 no. de personas 3

IV.- Artículos de divulgación (indique número):

- a) En el extranjero -----
- b) Nacionales

V.- Libros (indique número):

- a) Terminados
- b) Publicados
- c) En proceso

VI. Capítulos de libros (indique número):

- a) Terminados
- b) Publicados
- c) En proceso

VII.- Tesis (indique número) terminadas en proceso

- a) Licenciatura -----
- b) Maestría -----
- c) Doctorado 1 -----

VIII.- Profesores invitados (Indique número):

- a) Del extranjero
- b) Nacionales

IX.- Patentes (indique número):

- a) Internacionales
- b) Nacionales

**ANEXO AL INFORME TÉCNICO SOBRE EL PROYECTO: CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRIÓN CIGÓTICO DE COCOTERO *Cocos nucifera* L.**

**TESIS DESARROLLADAS BAJO ESTE PROYECTO**

**ALUMNOS GRADUADOS A NIVEL DOCTORADO**

Islas Flores Ignacio Rodrigo. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DEL DESARROLLO DEL EMBRION CIGÓTICO DE COCOTERO (*Cocos nucifera* L.).  
14 de diciembre de 1998.

**TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS**

**a) INTERNACIONALES**

Islas-Flores I., Chan J.L., Oropeza C., and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1996). Protein phosphorylation in tyrosine residues in zygotic and somatic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L): determination of tyrosine kinase activity. Presentado en el fifteenth annual symposium on phosphorylation-dephosphorylation of plant proteins. Realizado en la Universidad de Missouri Coulumbia USA, del 17 al 20 de abril.

Islas-Flores Ignacio, Chan J. L., Oropeza C. and Hernandez-Sotomayor S.M.T (1998). Protein tyrosine phosphorylation in coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos and in plumular tissues cultured *in vitro* in a medium that induces somatic embryogenesis in coconut: determination of tyrosine kinase activity and phosphoaminoacid analysis. III Congreso Latinoamericano de Biotecnología vegetal. Habana, Cuba del 1 al 5 de junio.

**b) NACIONALES**

Islas-Flores Ignacio Rodrigo, Oropeza C. y S. M. T. Hernández-Sotomayor (1996). "Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el patrón de fosforilación en tirosina de embriones cigóticos de cocotero cultivados *in vitro* (1996).

**Trabajo premiado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica con la beca Socios Fundadores.**

## **ARTÍCULOS ACEPTADOS CON RESULTADOS DEL PROYECTO.**

Islas Flores I., Oropeza C. and Hernández Sotomayor S.M.T. (1998). Protein phosphorylation during coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo development. *Plant Physiology* 118: 257-263.

Islas Flores I., Chan J. L., Oropeza C., and Hernández Sotomayor S.M.T. (1996). Protein phosphorylation in tyrosine residues in zygotic and somatic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): determination of tyrosine kinase activity. *Current Topics in Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology* pp. 135. Abstract

Islas-Flores Ignacio, Chan J. L., Oropeza C. and Hernandez-Sotomayor S.M.T (1998). Protein tyrosine phosphorylation in coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos and in plumular tissues cultured *in vitro* in a medium that induces somatic embryogenesis in coconut: determination of tyrosine kinase activity and phosphoaminoacid analysis. 3rd Latin-American Meeting on Plant Biotechnology. Abstract

## **ARTÍCULOS SOMETIDOS**

Islas-Flores I., Chan Jose L., Oropeza C. and Hernández-Sotomayor S.M.T. Occurrence of phosphorylated proteins and kinase activity in coconut tissues cultured *in vitro* in a medium that induces somatic embryogenesis. *Plant and Cell Physiology*.

## **COMENTARIOS E INFORMACION ADICIONALES.**

### **Resumen de resultados obtenidos durante la realización de este proyecto**

Se implementaron las técnicas histológicas, descritas inicialmente por Darleen y Sehkar (1990), las cuales permitieron realizar un seguimiento de los cambios histológicos que acompañan al desarrollo del embrión cigótico de cocotero. Los resultados mostraron que durante la maduración de las semillas de cocotero, los embriones cigóticos de esta especie, sufren cambios histológicos y morfológicos que se reflejan en la organización y diferenciación del embrión, dado que en los embriones en estadios inmaduros se observó polaridad celular (localización de las células apicales del embrión y células del suspensor), en contraste en los embriones maduros

se observó una mayor histodiferenciación celular ya que la plúmula, los cotiledones, el haustorio y los haces provasculares que rodean al haustorio fueron localizados rápidamente.

#### DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA

Utilizando anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina (RC20H Transduction Labs) se estableció que tanto en los embriones cigóticos de cocotero, como en tejidos de esta especie que están siendo cultivados *in vitro* en un medio inductor de la embriogénesis (Chan J. L., Saenz L, Talavera C. et al., 1998), existen proteínas que se fosforilan en este aminoácido. Esta fosforilación es de tipo dinámico, dado que se inmunodetectaron 4 proteínas con pesos moleculares de 175, 151, 125 y 108 kDa, las cuales estuvieron presentes en las etapas iniciales de la embriogénesis cigótica o en los tejidos de cocotero con mayor potencial embriogénico (Cuadro I); en contraste, en las etapas posteriores de desarrollo, estas proteínas no fueron inmunodetectadas (Cuadro I).

#### COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EMBRIONES CIGÓTICOS Y EN LOS TEJIDOS DE COCOTERO CULTIVADOS *IN VITRO*

En el cuadro II se presentan las diferentes pruebas experimentales a las cuales fueron sometidos los modelos de estudio. En este cuadro se muestra que después de que se realizó la fosforilación de proteínas en presencia de  $[^{32}\text{P}]\gamma\text{-ATP}$ ; proteínas con masas moleculares de 175, 125, 44, 41, 33 y 27 kDa, resultaron fosforiladas. Similarmente se observa que de estas  $[^{32}\text{P}]$ -proteínas, las de pesos moleculares de 175, 125, 44, 41 y 27 kDa también fueron inmunodetectadas por el anticuerpo monoclonal contra fosfotirosina, lo cual sugiere que al menos una parte del  $^{32}\text{PO}_4^-$  que se incorporó a las mismas, lo hizo en residuos de tirosina.

Debido a que la utilización de anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina no es una prueba contundente de la presencia de fosfotirosina en las proteínas, se decidió utilizar técnicas adicionales que permitieran apoyar o descartar la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, en los tejidos y en los embriones

cigóticos de cocotero. Inicialmente se aplicó un tratamiento con KOH 1 M. Este tratamiento remueve la fosforilación en los residuos de serina y treonina y no afecta la fosforilación en los residuos de tirosina. En el cuadro II se observa que después de que las [ $^{32}\text{P}$ ]-proteínas fueron tratadas con KOH 1 M, proteínas con pesos moleculares de 175, 125, 41 y 27 kDa permanecieron con  $^{32}\text{PO}_4^-$  incorporado. Esta nueva evidencia sugirió que esas cuatro [ $^{32}\text{P}$ ]-proteínas mantenían residuos de fosfotirosina.

El hecho de que las proteínas resulten fosforiladas no indica si estas son proteínas con capacidad de cinasas, o si estas son sustratos de otras cinasas; debido a que en el presente estudio se tenía interés en realizar esta caracterización, las proteínas desnaturalizadas de los tejidos y de los embriones cigóticos de cocotero fueron sometidas a un proceso de renaturalización y autofosforilación en presencia de [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP. El resultado mostró que en ambos sistemas, una proteína de 41 kDa se autofosforiló, lo cual sugiere que la misma tiene actividad de cinasa. El hecho de que esta proteína de 41 kDa haya sido inmunodetectada por el anticuerpo monoclonal contra fosfotirosina sugiere que esta proteína se autofosforiló en residuos de tirosina, por lo cual también se puede decir que esta proteína posee actividad de cinasa de tirosina.

Por último, la separación de los [ $^{32}\text{P}$ ]-aminoácidos a partir de la [ $^{32}\text{P}$ ]-proteína de 41 kDa permitió demostrar la presencia de fosfotirosina en los embriones y en los tejidos de cocotero cultivados *in vitro*, en un medio inductor de la embriogénesis (Cuadro II).

#### PROTEÍNAS CON POTENCIAL COMO MARCADORES DE EMBRIOGÉNESIS.

Las proteínas que potencialmente podrían ser empleadas como marcadoras del potencial embriogénico en los tejidos de cocotero se resumen en el cuadro I. Estas proteínas de 175, 151, 125 y 108 kDa, fueron elegidas en base a los cambios de reactividad que mostraron con el anticuerpo monoclonal contra fosfotirosina en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones cigóticos de cocotero y en los tejidos de esta misma especie que están siendo cultivados *in vitro* en un medio inductor de la embriogénesis de cocotero.



