

# CUANTIFICACION DE HORMONAS VEGETALES POR MEDIO DE ANTICUERPOS

Gutiérrez Rodríguez, M.; A. Larqué Saavedra

Programa de Botánica. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. C.P. 56230.

**RESUMEN.** La producción de anticuerpos monoclonales específicos para hormonas vegetales puede realizarse hoy en día. La cuantificación de hormonas vegetales es de gran interés para los científicos interesados en explicar procesos fisiológicos. En años recientes, se han establecido los inmunoensayos para su detección y cuantificación. Los anticuerpos monoclonales son utilizados para el inmunoensayo por la gran especificidad, pues no reaccionan con otros compuestos similares a las hormonas. Los inmunoensayos pueden detectar bajas concentraciones de hormonas vegetales igualando o superando a los métodos fisicoquímicos. Una de las ventajas de los inmunoensayos es que la muestra vegetal no necesita gran pureza como en los métodos fisicoquímicos, y además se pueden analizar muchas muestras al mismo tiempo. En el presente reporte presentamos información actualizada y básica acerca de este tema.

**PALABRAS CLAVE:** Hormonas vegetales, biorreguladores vegetales, reguladores de crecimiento vegetal, inmuno-ensayos, ELISA.

## PLANT HORMONES QUANTIFICATION BY ANTIBODIES

**SUMMARY.** Production of specific monoclonal antibodies for plant hormones can be carried out today. Endogenous plant hormones concentrations have always been a great challenge for scientists who are interested in explaining physiological processes. In recent years, it has been established immunoassays for the detection and quantification of plant hormones. Monoclonal antibodies are used for the immunoassay because The immunoassays can detect even lower concentrations of plant hormones than physicochemical methods. They are very specific and do not react with other compounds similar to the hormones. The advantages for the use of immunoassays in plant samples are: that the samples do not need to be as pure as those needed for physicochemical methods, and several samples can be analyzed at the same time. In the present report we updated basic information on this topic.

**KEY WORDS:** Plant hormones, plant biorregulator, plant growth regulator, immunoassay, ELISA.

## INTRODUCCION

Muchos de los aspectos del ciclo de vida de una planta están controlados por hormonas vegetales. Las hormonas vegetales como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno están involucradas en el control del crecimiento y diferenciación así como en la regulación de actividades metabólicas (Davies *et al.*, 1985; Taiz y Zeiger, 1991).

Cada hormona vegetal tiene múltiples efectos, dependiendo del sitio de acción, la etapa de desarrollo de la planta y la concentración de la hormona (Taiz y Zeiger, 1991).

Las hormonas vegetales son producidas en concentraciones muy pequeñas, y pueden actuar alterando la expresión de genes, la actividad de enzimas o cambiando las propiedades de las mem-

branas. Esto provoca cambios en el metabolismo y desarrollo de la célula. (Taiz y Zeiger, 1991).

Las auxinas promueven la elongación de células en tallos jóvenes o coleoptilos, la auxina natural más reportada es el ácido indolacético (AIA). Las citocininas estimulan la división celular de raíces, embriones y frutos. Las giberelinas estimulan el crecimiento en hojas y tallos, pero tienen poco efecto sobre el crecimiento en raíces. El desarrollo del fruto es otro caso en el cual actúan en conjunto con auxinas y citocininas. También, las giberelinas son liberadas por el embrión para romper la latencia e inducir la germinación de la semilla. El ácido abscísico es un inhibidor del crecimiento, interviene en fenómenos como la latencia de yemas durante el invierno e inhibe la división celular en el cambium vascular. Además el ácido abscísico ayuda a la planta a soportar condiciones de sequía cuando se

acumula en la hoja y causa el cierre de estomas. Por último, el etileno se conoce que interviene en la maduración de frutos, como inhibidor de la elongación celular y acelerador en procesos de senescencia (Taiz y Zeiger, 1991).

Las técnicas de extracción y purificación son necesarias para estimar concentraciones de hormonas en plantas (Larqué-Saavedra y Rodríguez-González, 1993). Los métodos fisicoquímicos tales como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) y espectrometría de masas, y algunas de sus combinaciones han sido utilizados para cuantificar hormonas vegetales, sin embargo, durante los últimos años se ha establecido una metodología generando anticuerpos específicos para su detección y cuantificación, (Walton *et al.*, 1979; Weiler, 1982; Wiler, 1984; Weiler *et al.*, 1986). Para establecer un inmunoensayo es posible realizarlo utilizando anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales (suero del animal), en este último varios anticuerpos pueden llegar a reconocer a la hormona vegetal.

Actualmente, es posible producir un número grande de anticuerpos específicos contra alguna molécula. El grado de afinidad, las propiedades físicas y el grado específico del anticuerpo pueden seleccionarse, según los fines de la investigación. La producción de anticuerpos monoclonales involucra un gran consumo de tiempo, pero afortunadamente existe una amplia gama de anticuerpos que son comercializados por diferentes compañías en el mundo (Campbell, 1984; Goding, 1986; Wang, 1990; Weiler *et al.*, 1986).

Así, los anticuerpos producidos contra una hormona vegetal son usados para establecer los métodos de detección y cuantificación llamados inmunoensayos, que son de dos tipos; uno llamado inmunoensayo tipo ELISA por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay y el otro denominado radioinmunoensayo, en el cual además del anticuerpo se utiliza radioactividad para la detección y cuantificación de la hormona, más adelante se explicará en que consiste cada uno de ellos.

Los radioinmunoensayos en tejidos vegetales fueron establecidos por Walton *et al.* (1979) y Weiler (1979), ambos originaron anticuerpos en conejos. Los primeros inmunoensayos de tipo ELISA fueron reportados por Weiler (1982) y Daie y Wyse (1980, 1982).

Los inmunoensayos proveen dentro de la fisiología vegetal, una herramienta más para medir concentraciones de hormonas en tejidos vegetales, lo que

permite tener un mejor entendimiento de su distribución celular, fisiología y bioquímica (Davies *et al.*, 1985; Neill y Horgan, 1987; Tahara *et al.*, 1991; Taiz y Zeiger, 1991; Walker-Simmons y Abrams, 1991; Walton *et al.*, 1979; Weiler, 1982; Weiler, 1984). El desarrollo de inmunoensayos ha dado como resultado un método rápido y sensible, dado que se pueden procesar un gran número de muestras vegetales (Davies *et al.*, 1985).

## RESPUESTA INMUNOLOGICA

El sistema inmune de cualquier animal reconoce y elimina a invasores o sustancias extrañas mediante un proceso conocido como respuesta inmunológica. Una sustancia capaz de producir una respuesta inmunológica es llamado antígeno. El concepto antígeno es muy usado para indicar las moléculas que reaccionan con los anticuerpos, los antígenos más comunes son las proteínas y los polisacáridos; en este sentido la hormona vegetal es un antígeno (Becker y Deamer, 1991). En la sangre de mamíferos, existen dos clases de células llamadas linfocitos; los B y T, siendo los linfocitos B los que producen anticuerpos, cada linfocito lleva consigo anticuerpos unidos a la membrana plasmática, en su superficie exterior (Becker y Deamer, 1991).

En teoría, el sistema inmune de cualquier animal puede producir anticuerpos, los cuales más tarde pueden aislarse y separarse para usarse en los inmunoensayos (Campbell, 1984; Goding, 1986; Wang, 1990; Weiler, 1984).

## EL ANTICUERPO COMO MOLECULA

Cada molécula de anticuerpo (también denominado inmunoglobulina G) tiene dos funciones; reconocer el antígeno uniéndose a él y asistir en su destrucción y eliminación. La molécula de anticuerpo tiene forma de 'Y', con dos sitios idénticos de enlace para el antígeno en sus ramificaciones y un sitio efector que es largo (Figura 1). Las dos ramificaciones (sitios de reacción del antígeno), están conectadas al sitio efector por medio de una región giratoria. La estructura de la región giratoria, permite a las ramificaciones ser flexibles y unirse a dos moléculas de antígeno simultáneamente. La molécula del anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que son idénticas, respectivamente en cada ramificación hay una cadena pesada y una ligera. El peso de la cadena ligera llega a ser de 23,000 Daltones y el de la pesada de 55,000 Daltones (Becker y Deamer, 1991).

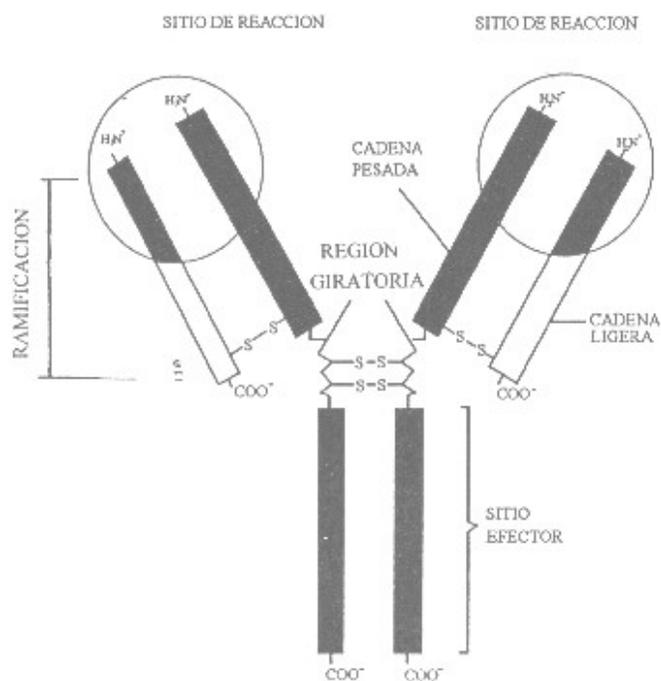


Fig. 1. Estructura molecular de un anticuerpo.

### COMPLEJO HORMONA-PROTEINA

Todas las hormonas vegetales son de bajo peso molecular y no producen respuesta inmunológica en el animal, por lo que tienen que ser unidas a una proteína para formar una molécula más grande. Como la proteína si produce una respuesta inmunológica en el animal, se producen anticuerpos contra la proteína, pero también anticuerpos contra la hormona vegetal. Más tarde, pueden aislarse y separarse estos anticuerpos específicos contra la hormona vegetal y usarse en el inmuno ensayo (Wang, 1990; Weiler, 1984; Weiler *et al.*, 1986).

La albúmina de suero bovino y albúmina de suero humano son proteínas utilizadas para acoplar hormo-

nas vegetales en relación hormona: proteína de 4:1 y hasta de 10:1 para ácido abscísico, citocininas y giberelinas (Wang, 1990).

### ANTICUERPO MONOCLONAL Y ANTISUERO

Para el establecimiento de los primeros inmunoensayos se utilizó suero obtenido de los animales inmunizados, a lo cual se le denominó antisuero contra hormonas vegetales, pero el problema con estos antisueros es que contienen varios anticuerpos algunos de los cuales reaccionan contra la hormona vegetal y otros reaccionan contra la albúmina a las que están unidas. El antisuero puede ser purificado en una columna de afinidad y así obtener un solo anticuerpo contra un antígeno específico; sin embargo, aún pueden haber otros anticuerpos después de la purificación (Weiler *et al.*, 1986). Además se tiene el problema de que llegan a reaccionar con algunos análogos o conjugados de las hormonas vegetales que tienen una estructura muy similar a la forma libre de la hormona.

Posteriormente, con el desarrollo de las técnicas inmunológicas se aislaron los anticuerpos específicos que sólo reaccionaron con la hormona vegetal y se les denominó anticuerpos monoclonales. Los linfocitos B que son las células que producen anticuerpos específicos contra una hormona vegetal, pueden fusionarse con una célula cancerosa que se divide numerosamente y formar un híbrido, el cual puede dividirse en gran número y al mismo tiempo producir anticuerpos de un solo tipo (Campbell, 1984; Goding, 1986; Weiler *et al.*, 1986).

Los anticuerpos monoclonales son una importante herramienta en los inmunoensayos y ahora es posible generar cantidades grandes de anticuerpos monoclonales contra una hormona vegetal específica. La ventaja principal de los anticuerpos monoclonales es que la contaminación por otros anticuerpos que puedan reaccionar con el antígeno es totalmente descartada

CUADRO 1. Características del antisuero y anticuerpo monoclonal (Tomado de Weiler, 1984).

Anticuerpo monoclonal	Antisuero
b Consume tiempo y es caro de realizar el proceso para la obtención del anticuerpo	b Relativamente barato y fácil de obtener los anticuerpos
b Hay que realizar varias revisiones durante su desarrollo.	b Solamente una revisión final durante su realización
b Alta afinidad y capacidad específica de los anticuerpos	b Una moderada afinidad y capacidad específica
b Monoclonales	b Policlonales

por la especificidad con la que actúan (Cuadro 1).

La producción de anticuerpos monoclonales a partir de los híbridos descritos anteriormente, es un proceso caro y se requiere de un laboratorio especializado en inmunología, existen diferentes compañías que producen anticuerpos monoclonales Idetec (E.U.), Phytoscience (Francia). En cambio, la producción de un antisero uniforme contra una hormona vegetal, puede tomar unos cuantos meses en un laboratorio no especializado en inmunología. Hoy en día el uso de antiseros contra hormonas vegetales ha quedado restringido, pues por la gran especificidad de los anticuerpos monoclonales, son más aceptados para la detección y cuantificación de éstas.

### ESTABLECIMIENTO DE INMUNOENSAYOS

Para el establecimiento de un inmunoensayo ELISA, generalmente se utiliza una placa de poliestireno (Figura 2), la cual tiene 96 pozas de un tamaño aproximado de 0.7 centímetros de diámetro por 1.2 centímetros de profundidad, el volumen de cada poza es de unos 300 microlitros (0.3 mililitros). El volumen utilizado es pequeño ya que la cantidad de anticuerpos también lo es, además la hormona vegetal se encuentran en cantidades muy bajas, por lo que este sistema de inmunoensayos está desafrollado para detectar pequeñas cantidades de hormona vegetal en el orden de picogramos. Los soportes sólidos (placas) absorben los anticuerpos por medio de interacciones hidrofóbicas, el anticuerpo es agregado en cada poza (200  $\mu$ l) con un amortiguador de pH 7.5, lo que favorece que el anticuerpo se adhiera a la pared de la poza y se incuba la placa durante 24 horas a 4°C. Una vez que los anticuerpos están sujetos al soporte, puede agregarse la hormona obtenida de la muestra vegetal y la otra hormona la cual está unida a una enzima (Figura 3A) (Campbell, 1984; Engvall y Perlmann, 1972a; Engvall y Perlmann, 1972b; Goding, 1986).

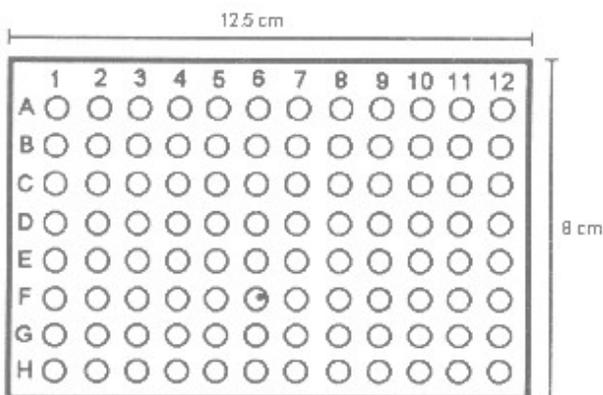


Fig. 2. Placa de ELISA para realizar el inmunoensayo

La hormona vegetal se agrega con un amortiguador (pH 7.5) para que reaccione con el anticuerpo monoclonal, también la hormona vegetal unida a la enzima como una fosfatasa es agregada al mismo tiempo. La hormona vegetal libre y la hormona vegetal con enzima van a competir por los sitios de anclaje de los anticuerpos (Figura 3A). Algunos anticuerpos van a reaccionar con la hormona vegetal libre (extraída de la planta) o bien reaccionar con la hormona vegetal con enzima, ambas hormonas van a competir por los sitios de reacción del anticuerpo monoclonal. Al final se agrega el sustrato de la enzima para desarrollar color.

Si hubo mucha hormona en la muestra vegetal la intensidad del color de la poza de la placa de ELISA va a ser muy tenue, por el contrario, si en otra poza el color se desarrolla muy intenso, significa que la concentración de la hormona vegetal libre es muy baja, la mayoría de la hormona vegetal con enzima se pegaron a los anticuerpos. De esta manera, establecemos que la concentración de la hormona vegetal libre es inversamente proporcional a la intensidad del color desarrollado (Weiler *et al.*, 1986).

Otro sistema utilizado para el inmunoensayo ELISA es hacer un conjugado de hormona-proteína (ácido abscísico-albúmina de suero bovino por ejemplo) y pegarse directamente a la pared de la poza de la placa, la albúmina se pega y la hormona es la que queda disponible para reaccionar con el anticuerpo monoclonal (Figura 3B). Al agregar a la poza el anticuerpo monoclonal y la hormona de la muestra vegetal, algunos anticuerpos reaccionan con esta última y otros con la hormona vegetal que se encuentra unida a la albúmina. Finalmente, se agrega otro segundo anticuerpo que está unido con una enzima, para que reaccione con el anticuerpo monoclonal, al agregar el sustrato de la enzima podemos cuantificar la concentración del antígeno por medio de una reacción enzimática y al igual que en el sistema anterior también el color es inversamente proporcional a la concentración de la hormona de la muestra vegetal (Weiler *et al.*, 1986).

Una vez que el anticuerpo monoclonal y la hormona vegetal reaccionaron, las muestras son leídas en espectrofotómetros adaptados a las placas de ELISA, la longitud de onda a que se lee depende de la enzima utilizada en el sistema, por ejemplo, para la fosfatasa alcalina es de 410 nanómetros (Campbell, 1984).

En el radioinmunoensayo el anticuerpo monoclonal es combinado con la hormona de la muestra vegetal directamente sin pegar el anticuerpo monoclonal a la pared de la poza. La hormona vegetal está marcada radioactivamente (tricio [ $^3$ H], por ejemplo), también se agrega a la poza. Ambas moléculas de hormona (libre y

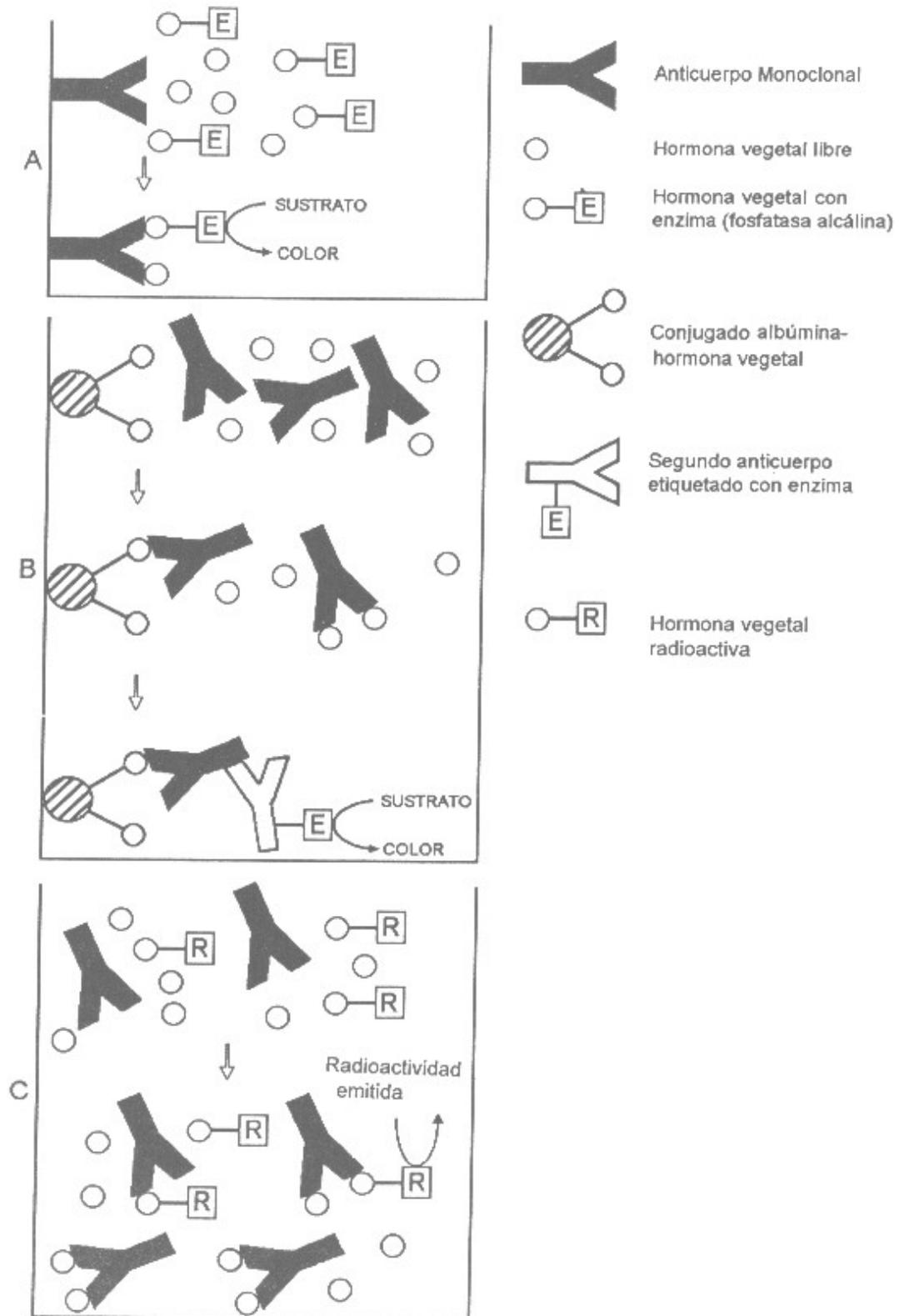


Fig. 3. Esquema que representa el sistema ELISA con anticuerpo Inmovilizado (A), con antígeno inmovilizado (B) y el sistema de radioinmunoensayos (C).

adioarctiva) reaccionan con los anticuerpos monoclonales que se encuentran suspendidos en la poza. Si la concentración de hormona vegetal libre extraída de la planta es alta, la emisión de radioactividad será baja, porque muy poca hormona vegetal radioactiva se pegó a los anticuerpos; por el contrario, si la concentración de la hormona vegetal libre es baja, entonces mucha hormona vegetal radioactiva reacciona con los anticuerpos y la emisión de radioactividad será alta. La emisión de radioactividad es inversamente proporcional a la concentración de la hormona vegetal extraída de la planta (Figura 3C). En un contador de cuentas se puede detectar la emisión de radioactividad (Campbell, 1984).

### EL USO DE INMUNOENSAYOS

Como ya se mencionó, las hormonas vegetales pueden ser cuantificadas por los métodos fisicoquímicos como cromatografía de gases, HPLC, espectrometría de masas, etc. Estos métodos modernos de análisis han sido aplicados a todos los grupos de hormonas vegetales. Por su sensibilidad y precisión de análisis, el HPLC ha sido utilizado para cuantificar todos los tipos de hormonas excepto el etileno. El análisis de hormonas de crecimiento por cromatografía de gases en combinación de espectrometría de masas ha sido también utilizada para la identificación de hormonas vegetales. Sin embargo, estos métodos son demasiado caros y consumen mucho tiempo para un análisis de rutina y múltiples muestras. En estos métodos se tienen que remover todos los compuestos que interfieren el análisis de una hormona, compuestos que están presentes en un tejido vegetal como hoja, tallo, raíz, etc. (Davies *et al.*, 1985). Hay que hacer toda una serie de particiones con diferentes solventes como metanol, éter, diclorometano, etc., de las muestras vegetales para remover impurezas, siendo este procedimiento muy tedioso y además llega a haber pérdidas de la hormona y es un procedimiento que consume mucho tiempo. En contraste, los inmunoensayos tienen una alta selectividad, por la gran afinidad de los anticuerpos hacia las hormonas vegetales y pueden detectar bajas cantidades de éstas, cantidades del orden de picogramos de hormona vegetal ( $10^{-12}$  g) en extractos de baja pureza, son de rápida realización y relativamente baratos.

Con la producción de anticuerpos monoclonales, los inmunoensayos han llegado a ser ampliamente usados en procesos fisiológicos, genéticos y bioquímicos en donde están involucradas las hormonas vegetales (Daie y Wyse, 1982; Davies *et al.*, 1985; Hirai, 1986; Mertens *et al.*, 1983; Wang, 1990; Weiler, 1982; Weiler *et al.*, 1986). Estos métodos se han utilizado para de-

Cuantificación de hormonas.

terminar hormonas vegetales en floema, protoplastos de células guarda, raíz e hipocotilo, así como para analizar los gradientes en plantas.

La capacidad específica de un anticuerpo monoclonal es dependiente de la naturaleza del enlace químico del conjugado (hormona-proteína). Los anticuerpos monoclonales contra conjugados de ácido abscísico unido a albúmina de suero de bovino al carbono 1 reaccionan a través del grupo carboxilo (Figura 4). En cambio, los anticuerpos monoclonales producidos por el conjugado para ácido abscísico unido con albúmina de suero bovino en el Carbono 4', son más específicos.

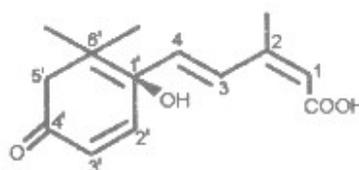


Fig. 4. Estructura química del ácido abscísico.

La reproducción y precisión son necesarios en los inmunoensayos por lo que se deben de tomar en cuenta los siguientes factores (Weiler *et al.*, 1986):

- 1). Los componentes similares a las hormonas, pueden tener alta afinidad por los anticuerpos y podrían reaccionar con éstos.
- 2). El uso de detergentes o residuos de solventes como metanol, éter, etc., utilizados durante el procedimiento de extracción de la muestra vegetal o durante la realización del inmunoensayo, pueden perjudicar al anticuerpo monoclonal, provocando que se suelte de la placa.
- 3). La pérdida de hormona durante su extracción puede afectar la precisión del inmunoensayo.

Para el caso de ácido abscísico, se hizo un seguimiento con tres diferentes anticuerpos monoclonales obtenidos en diferentes laboratorios, para saber con cuales análogos podrían reaccionar, pues están presentes en una estructura similar a la hormona original (Tahara *et al.*, 1991).

La especificidad de los anticuerpos para diferentes análogos similares en estructura química al ácido abscísico fueron comparados. Dos anticuerpos el 15-Y-15 y DPBA, son altamente específicos para el análogo (+)-2',3'-dihidro-ácido abscísico con un 72 y 86% de reacción, respectivamente. El tercer anticuerpo MAC62 no tuvo reacción con este análogo, pero reaccionó con

otro análogo, el (+)-2',3'-dihidro-ácido abscísico-acetilénico con una reacción del 44%, mientras que los otros anticuerpos monoclonales no tuvieron reacción con este compuesto. Esto demuestra que los anticuerpos monoclonales preparados para el mismo regulador de crecimiento pueden tener diferente especificidad y limitaciones para medir ácido abscísico de una planta en la presencia de sus análogos (Walker-Simmons *et al.*, 1991).

Hoy en día se han producido anticuerpos monoclonales contra todas las hormonas a excepción del etileno que por su configuración gaseosa es ideal cuantificarlo por cromatografía de gases (Davies *et al.*, 1985; Taiz y Zeiger, 1991).

Los inmunoensayos ELISA son menos caros que los radioinmunoensayos, pues no requieren de hormonas radioactivas o el equipo complejo de laboratorio. Sin embargo, ambos sistemas han sido ampliamente usados para la determinación cuantitativa de hormonas vegetales (Tahara *et al.*, 1991; Walton *et al.*, 1989; Weiler, 1979; Wiler, 1982). La sensibilidad de inmunoensayos tipo ELISA es comparable a los radioinmunoensayos para el caso de la cuantificación de ácido abscísico. Los radioinmunoensayos facilitan considerablemente el análisis de hormonas vegetales; sin embargo, el costo de material radioactivo, las restricciones legales para su uso y el equipo para realizar estos ensayos, pueden ser un obstáculo para muchos laboratorios. El inmunoensayo tipo ELISA es una alternativa viable, ya que este método es fácil de llevar a cabo, de gran precisión y no se requiere un equipo sofisticado para realizarlo.

Pocas validaciones han sido realizadas para verificar la confiabilidad de datos obtenidos de inmunoensayos. Roshers *et al.* (1985), hicieron una validación para ácido abscísico con radioinmunoensayos y cromatografía de gases/espectrometría de masas como una técnica de medida estándar en manzana y batata, ellos encontraron que los resultados de ambos métodos fueron similares.

Se han comparado resultados obtenidos con inmunoensayos ELISA para ácido abscísico con cromatografía de gases/espectrometría de masas y HPLC para muestras tomadas de granos de maíz, hojas de tomate y agujas de pino. En todos los casos los inmunoensayos ELISA dio una sobrestimación de los niveles de ácido abscísico, particularmente en muestras de alta concentración (Walker-Simmons and Abrams, 1991). Estos hallazgos sirven para enfatizar que los inmunoensayos, tienen que ser probados para cada muestra vegetal de una especie en particular, pues una hoja de maíz puede tener más pigmentos o compuestos que deben ser removidos que en el caso de tomate o pino.

Hay que revisar cuantitativamente con otro método como cromatografía de gases/espectrometría de masas o HPLC, para que la técnica de inmunoensayos sea más aceptada en la determinación de hormonas vegetales (Kannangara y Simpson, 1984; Leroux *et al.*, 1985; Neill y Horgan, 1987; Norman *et al.*, 1988; Quarrie *et al.*, 1988).

#### PREPARACION DE LA MUESTRA VEGETAL

Antes del inmunoensayo, es necesario preparar la muestra de la planta en estudio. primeramente, se extrae y se purifica para que otros compuestos no intervengan en la cuantificación con el anticuerpo monoclonal y la hormona vegetal, pero a diferencia de los métodos fisicoquímicos en el inmunoensayo sólo hay que purificar o limpiar un poco la muestra vegetal, pues no es necesario quedar muy limpia.

Un extracto o fracción de material vegetal, puede ser considerado inmunológicamente pura, cuando (Beliefant y Fong, 1989, Weiler *et al.*, 1986).

- a) La hormona vegetal puede ser analizada y no ocurre una reacción con otro compuesto presente en el medio.
- b) Si la interacción de hormona-anticuerpo no es afectada por otros componentes presentes en la muestra.

El procedimiento para la preparación de una muestra vegetal es el siguiente (Walker-Simmons *et al.*, 1986).

- a) Una homogeneización generalmente con metanol al 80%.
- b) Extraer la hormona vegetal en el metanol 80% de 12 a 48 hrs del tejido a 4°C.
- c) Centrifugar y coleccionar el metanol para su posterior procesamiento.
- d) Purificar el metanol en un cartucho de cromatografía de 18 carbonos (C<sub>18</sub>) de fase reversa para remover lípidos y pigmentos.
- e) Volatizar el metanol completamente del extracto para que la hormona vegetal se concentre.
- f) Diluir la muestra con amortiguador pH 7.5, para favorecer la reacción hormona vegetal-anticuerpo monoclonal.

Sin embargo, durante el procesamiento de la muestra vegetal por el método descrito, se puede llegar a perder hormona por la manipulación que se hace de ésta, pues se queda impregnada hormona vegetal en el vidrio de los recipientes utilizados, en la columna de cromatografía, etc., por lo que hay que estimar su pérdida utilizando una hormona vegetal marcada con ra-

dioactividad ( $[^3\text{H}]$  tritio, por ejemplo) a la cual se le denomina estándar interno y que se agrega al extracto crudo inicial (Norman *et al.*, 1988; Walker-Simmons *et al.*, 1991).

Dado que la hormona vegetal radioactiva se agrega al inicio del proceso de extracción en el metanol al 80%, se espera que si hubo pérdida de hormona durante el procedimiento de extracción y purificación de la muestra, tendremos menos cantidad de hormona radiactiva en la cuantificación final. El procedimiento de eficiencia de purificación puede realizarse de dos formas; la primera agregando hormona vegetal radioactiva sin la presencia de un tejido vegetal y segundo agregar al inicio la hormona vegetal radioactiva con la presencia de tejido vegetal. La pérdida de la hormona puede cuantificarse por medio de la emisión de radioactividad, pues sabemos cuanta tenemos en un inicio y cuanta nos queda al final. Otra manera de estimar cuanta hormona vegetal se está perdiendo, es agregar una concentración conocida de hormona al inicio del procedimiento de limpieza y checar la cantidad de hormona presente al final de dicho procedimiento por el inmunoensayo (Walker-Simmons y Abrams, 1991).

Una de las grandes ventajas del método radioinmunoensayo es que no tiene que correrse un estándar para checar la pérdida de la hormona vegetal, ya que el anticuerpo monoclonal se agrega directamente a la muestra vegetal para que reaccione con la hormona, y la cuantificación es por radioactividad emitida y se conoce cuanto se está agregando al principio y cuanta se tiene al final. De todos los métodos de cuantificación incluyendo a los métodos fisicoquímicos de hormonas vegetales el radioinmunoensayo es lo único que no necesita de un estándar interno.

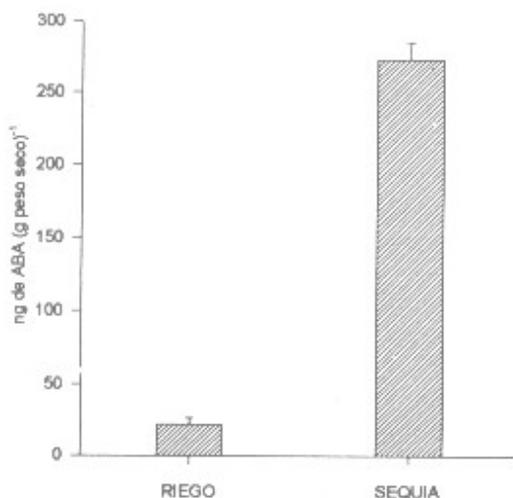


Fig. 5. Cuantificación de ácido abscísico por medio de un inmunoensayo ELISA en maíz Tuxpeño bajo condiciones de riego y sequía, medido en el Colegio de Postgraduados (Gutiérrez, 1995).

## CONCLUSIONES

La ventaja de los inmunoensayos es que pueden mejorar o igualar a los métodos fisicoquímicos, que han sido por excelencia los mejores para cuantificar hormonas vegetales. Sin embargo, la selectividad de los anticuerpos monoclonales se traduce en rapidez y menos manipulación de la muestra vegetal, además los anticuerpos son altamente selectivos, por lo que una reacción con otros compuestos puede llegar a ser descartada; sin embargo, se debe de tener cuidado, pues se piensa que algunos anticuerpos pueden llegar a reconocer algunos análogos como en el caso de ácido abscísico (Walker-Simmons *et al.*, 1991).

El uso de anticuerpos monoclonales aplicados para cuantificar y analizar hormonas vegetales, es una nueva herramienta en estudios de fisiología, bioquímica, etc. Los inmunoensayos es una metodología que se está usando comúnmente en laboratorios de todo el mundo en investigaciones de hormonas vegetales en plantas sometidas a condiciones ambientales adversas como sequía (Figura 5). La gran especificidad de los anticuerpos provee a los inmunoensayos gran seguridad y precisión en el análisis de hormonas vegetales un requisito indispensable en el estudio de éstas.

Otro aspecto que se debe de cuidar, es el de la interferencia de compuestos del extracto crudo en el corrimiento del inmunoensayo, ya que estos pueden afectar la reacción hormona vegetal-anticuerpo monoclonal y si es necesario debe de correrse el inmunoensayo con un método alternativo como la cromatografía de gases, HPLC, cromatografía de gases/espectrometría de masas, etc., para hacer la comparación entre ambos métodos. Además, es importante llevar estándares internos con los cuales se pueden saber cuanta hormona de la muestra vegetal se está perdiendo, para saber si el procedimiento utilizado para limpiar la muestra vegetal está funcionando para la especie con la que se está trabajando. No se debe de perder de vista que cada procedimiento de purificación de la muestra vegetal es diferente para cada especie que se esté estudiando.

La ventaja de los inmunoensayos es que son baratos, rápidos y no requieren de equipo especializado como en el caso de los métodos fisicoquímicos, por lo que son más accesibles.

## LITERATURA CITADA

- BECKER, W.M.; D.W. DEAMER. 1991. The World of the Cell. The Benjamin/Cummings Co. USA. pp. 741-772.
- BELEFANT, H.; F. FONG. 1989. Abscisic acid: organic acid interference. *Plant Physiology* 9:1467-70.

- CAMPBELL, A.M. 1984. Monoclonal Antibody Technology. Elsevier. Netherlands. 64 pp.
- DAIE, J.; R. WYSE. 1980. ELISA: A new technique for the quantification of abscisic acid. *Plant Physiology (sup)* 65:94.
- DAIE, Y.; R. WYSE. 1982. Adaptation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the quantitative analysis of abscisic acid. *Analytical Biochemistry* 119:365-371.
- DAVIES, G.C.; M.B. HEIN; B.C. NEELY; C.R. SHARP; M.G. CARNES. 1985. Strategies for the determination of plant hormones. *Analytical Chemistry* 57:638A-648A.
- ENGVALL, E.; P. PERLMANN. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Journal of Immunology* 109:129-135.
- ; -----, 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin-G. *Immunochimistry* 8:871-874.
- GODING, J.W. 1986. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press. London. 315 pp.
- GUTIERREZ R., M.; R. SAN MIGUEL CHAVEZ; T. NAVA SANCHEZ; A. LARQUE SAAVEDRA. 1995. Métodos avanzados en fisiología vegetal experimental. Colegio de Postgraduados. México. 119 páginas.
- HIRAI, N. 1986. Abscisic acid *In*: N. Takahashi. Ed. Chemistry of Plant Hormones. Florida, CRC press. pp 201-248.
- KANNANGARA, T.; G.M. SIMPSON. 1984. Analisis of abscisic acidin wheat leaves by a combination of high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *Journal of Chromatography* 283: 425-430.
- LARQUE-SAAVEDRA, A.; M.T. RODRIGUEZ GONZALEZ. 1993. Fisiología Vegetal Experimental. Aislamiento y Cuantificación de Reguladores de Crecimiento Vegetal. Ed. Trillas. México 193 pp.
- LEROUX, B.; R. MALDINEY; E. MIGINIAC; I. SOSSOOUNTZOV; B. SOTTA. 1985. Comparative quantitation of abscisic acid in plants extracts by gas-liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay using the avidin-biotin system. *Planta* 166:524-529.
- NEILL, S.J.; R.HORGAN. 1987. Abscisic acid and related compounds *In*: L. Rivier and A. Crozier (Eds). Principles and Practice of Plant Hormone Analyser. Vol. 1. Academic Press. USA. pp. 111-167.
- NOMAN, S.M.; S.M. POLING; V.P. MAIER. 1988. An indirect enzyme linked immunosorbent assay for (+)-abscisic acid in *Citrus*, *Ricinus* and *Xanthium* leaves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 36:225-231.
- MERTENS, R.; B. DEUS-NEUMANN; E.W. WEILER. 1983. Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of endogenous plant growth regulator, abscisic acid. *FEBS Letters* 160:269-272.
- QUARRIE, S.A.; P.N. WHITFORD; N.E.J. APPLEFORD; T.L. WANG; S.K. COOK; I.E. HENSON; B.R. LOVEYS. 1988. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173:330-339.
- ROSHER, P.H.; H.G. JONES; P. HEDDEN. 1985. Validation of a radioimmunoassay for (+)-abscisic acid in extracts of apple and sweet-pepper tissue using high-pressure liquid chromatography and combined gas chromatography mass spectrometry. *Planta* 165:91-99.
- TAHARA, M.; A.C. GUENZI; J.J. READ; B.F. CARVER; R.C. JOHNSON. 1991. Quantification of abscisic acid in wheat leaf tissue by direct enzyme immunoassay. *Crop Science* 31: 1185-89.
- TAIZ, L.; E. ZEIGER. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Co. USA. pp. 398-488.
- WALKER-SIMMONS, M.K.; S.R. ABRAMS. 1991. Use of abscisic acid immunoassay. *In*: W.J. Davies and H.G. Jones (Eds). *Abscisic Acid and Biochemistry*. Bios Scientific Publishers. USA. pp. 53-61.
- ; M.K.; M.T.J. REANEY; S.A. QUARRIE; P. PERATA; P. VERNIER; S.R. ABRAMS. 1991. Monoclonal antibody recognition of abscisic acid analogs. *Plant. Physiology* 95:46-51.
- WALTON, D.; W. DASHEK; E. GALSON. 1979. A radioimmunoassay for abscisic acid. *Planta* 146:139-45.
- WANG, T.L. 1990. Monoclonal antibodies and their applications to PGR research. *British Society for Plant Growth Regulation Monograph* 19:61-77.
- WEILER, E.W. 1979. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* 144:255-63.
- , 1982. An enzyme-immunoassay for cis-(+)-abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 54:510-514.
- , 1982. Plant hormone immunoassay. *Physiologia Plantarum* 54:230-234.
- , 1984. Immunoassays of plant growth regulators. *Annual Review Plant Physiology* 35:85-95.
- ; J. EBERLE; R. MERTENS; R. ATZORN; M. FEYERABEND; P.S. JOURDAN; A. ARNSCHEIDT; U. WIECZOREK. 1986. Antisera and monoclonal antibody based immunoassay of plant hormones. *In*: T.L. Wang (Ed.). *Immunology in Plant Science*. Cambridge University Press. London. pp. 27-58.