

9
lej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ONTOGENIA DE LATICIFEROS EN Ipomoea purpurea
(L.) ROTH (CONVOLVULACEAE) Y SU DETECCION
CON MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RAUL ALVA GONZALEZ

MEXICO, D. F.

1988.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Objetivos.....	4
ANTECEDENTES.....	5
MATERIAL Y METODO.....	25
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	42
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49

RESUMEN.

Se estudió el desarrollo de los laticíferos en la semilla de Ipomoea purpurea y se compararon las ventajas para su observación de dos sistemas ópticos: la microscopía de campo claro y la microscopía de fluorescencia.

El material se incluyó en metacrilato, se cortó a 2, 4 y 6 micra de grosor y se utilizó una doble tinción de fucsina ácida-verde de malaquita para la observación de los cortes en ambos sistemas. Este último no ofreció ventajas con respecto al primero en cuanto a la detección de los laticíferos.

Hasta la etapa globular del embrión no se detectó ningún cambio citológico que indicara el inicio de la diferenciación o formación de los laticíferos.

El proceso de diferenciación de los laticíferos en el desarrollo de la semilla de I. purpurea comienza como una hipertrofia celular y del núcleo, posteriormente se forma una vacuola central que gradualmente crece y desplaza el material citoplásmico hacia la periferia. El citoplasma se degrada poco a poco y por último degenera el núcleo. Paralelamente a la hipertrofia celular hay un engrosamiento de la pared. Los laticíferos son unicelulares y esféricos. Se desarrollan exclusivamente en

los tejidos cotiledonarios. No se encontraron en el eje embionario.

INTRODUCCION.

Los laticíferos han sido objeto de estudio en plantas de importancia económica y en diferentes partes de las mismas. En principio, uno de los enfoques fue el de buscar su función en la planta relacionando ésta con su morfología y su composición, aunque hasta ahora no se ha podido generalizar, dada la gran diversidad de resultados obtenidos.

El estudio del látex, ha tenido gran interés sobre todo en aquellas plantas en las que se encuentra en grandes cantidades (Hevea brasiliensis, Ficus, Parthenium, etc.), por la posible utilización comercial que se le pudiera dar.

La inquietud de algunos investigadores en describir el origen de los laticíferos ha conducido a la elaboración de trabajos en semillas (Euphorbia, Asclepia, Papaver), siendo éstos, en proporción, muy pocos con respecto a aquellos realizados en plantas establecidas.

La presencia de látex es un carácter utilizado en la diagnosis de la familia Convolvulaceae (Cronquist, 1981), sin embargo, a pesar de su importancia como

carácter diagnóstico, existen muy pocas investigaciones sobre plantas maduras y ninguno, conocido por nosotros, sobre semillas; por lo que, con este trabajo pretendemos contribuir al conocimiento de un carácter estructural poco conocido en las semillas de esta familia: los laticíferos.

Los objetivos de este trabajo son:

1.-Describir la ontogenia de los laticíferos de la semilla de Ipomoea purpurea.

2.-Describir la estructura de los laticíferos en la semilla madura.

3.-Determinar la etapa más temprana del desarrollo en la cual se puedan diferenciar los laticíferos como tales, del resto de las células circundantes mediante el uso de la microscopía de fluorescencia, comparándolo con la microscopía de campo claro.

ANTECEDENTES

PRIMEROS ESTUDIOS SOBRE LATICIFEROS.

Las angiospermas son plantas multicelulares, con varios tipos diferentes de células que están organizadas en grupos que se denominan tejidos.

Las células de cualquier tejido tienen un origen común y una función también común. Los tejidos en los cuales todas sus células son esencialmente similares se denominan tejidos simples. Los tejidos en los que existen muchos tipos de células, y las cuales contribuyen a una función común se denominan tejidos complejos. Cualquier grupo de tejidos que en forma colectiva forma un cuerpo externamente diferenciado se denomina órgano. Los órganos primarios del cuerpo vegetativo de una angiosperma son: la raíz, tallo y hojas (Cronquist, 1977).

Algunos tipos de tejidos se encuentran en las tres clases de órganos; otros están usualmente más restringidos. Algunos tejidos como el parénquima, colénquima y esclerénquima se caracterizan, en su mayor parte, por la naturaleza de las células que los componen; frecuentemente esos tejidos son partes de otros más complejos que contienen varios tipos de células.

Sin embargo, aunque en teoría, esta pueda ser una manera de delimitar tejidos, muchas veces en la práctica, el reconocimiento de estos se hace difícil, entre otros factores, porque las células componentes de los mismos no difieren mucho de las de su entorno, o porque la diferenciación de estas no ha llegado a su totalidad, o en el último caso, porque no constituyen un tejido como tal, y su localización sea aislada y/o poco frecuente.

De entre los distintos tejidos que encontramos en las plantas, los que se refieren a la conducción de materiales, han tenido un lugar especial en la investigación.

Los laticíferos han sido objeto de estudio intensivo desde los inicios de la anatomía vegetal (De Bary, 1884; Sperlich, 1939; cit. por Esau, 1965).

Por su distribución en la planta y su líquido, con frecuencia lechoso, que fluye cuando la planta se corta; el sistema laticífero fue comparado por los primeros botánicos con el sistema circulatorio de los animales. Se les llamo vasos de savia vital (lebenssaftgefasse). En 1918, Haberlandt consideró que el látex tenía valor nutricional en varias plantas. En 1939, Sperlich registró el látex como material de reserva. Más tarde se pensó que los laticíferos estaban relacionados con los elementos vasculares, particularmente con los tubos cribosos. (Esau, 1965)

Posteriormente los laticíferos se observaron como elementos morfológicamente distintos de los tubos cribosos pero relacionados con estructuras secretoras. La idea de la función de los laticíferos cambió de acuerdo con las distintas interpretaciones de su naturaleza morfológica. (Bonner y Galston, 1947; Whaley, 1940; cit. por Esau, 1965).

Falta aún información para determinar el papel que desempeñan los laticíferos en la vida de la planta.

Uno de los avances fue relacionar a los laticíferos con la conducción de alimentos, la evidencia para tal papel fue su alto contenido de material y su arreglo en la planta. Sin embargo no se ha observado un movimiento real de los materiales en los laticíferos. Los experimentos realizados para probar esto muestran resultados contradictorios, pero generalmente indican que materiales alimenticios presentes en el látex no son movilizados cuando las plantas son privadas de medios para formar carbohidratos. En los laticíferos el látex está bajo presión y por lo tanto, cuando los laticíferos se cortan el látex es expulsado. Esta es una presión de flujo. La dinámica de flujo del látex ha sido descrita con detalle por Frey-Wyssling (1952; cit. por Esau, 1965 y Fahn, 1979).

Como el látex absorbe agua de tejidos adyacentes, se ha pensado que esta relacionado con la regulación del balance hídrico de la planta.

Se ha descrito como un agente para el transporte de oxígeno, o como material utilizado por la planta para protección contra animales.

La interpretación más ampliamente aceptada del papel de los laticíferos, es que forman un sistema excretor. Los laticíferos acumulan muchas sustancias que se reconocen comunmente como materiales de excreción, y tales sustancias son más abundantes que las alimenticias. Los terpenos, incluyendo gomas y resinas no son funcionales como productos del metabolismo celular, particularmente en los tejidos jóvenes en crecimiento. Una vez depositados en las células, no se sabe que se utilicen de nuevo por la planta (Benedict, 1949; Boner y Galston, 1947; cit. por Esau, 1965).

Los terpenos altamente polimerizados, como las gomas, son incapaces de pasar a través de las paredes celulares y permanecen en las células en las que fueron formados.

Parece significativo, por lo tanto, que la formación de terpenos, de alto peso molecular, coincida con la presencia de laticíferos, que parecen estar adaptados como

depósitos para este tipo de sustancias excretadas. La resina, por otro lado, es frecuentemente excretada en pasajes intercelulares especializados, los ductos resiníferos; o a la superficie de la planta, a través de tricomas excretores. En 1935, Frey-Wyssling, menciona que en las compuestas, algunos grupos tienen sistemas laticíferos, otros, ductos resiníferos. Los dos tipos de estructuras no se presentan juntas (Esau, 1965).

MORFOLOGIA DE LATICIFEROS.

El látex se puede encontrar ya sea en series de células o en células aisladas; ambas estructuras especializadas se han llamado laticíferos.

Aunque las estructuras que contienen látex pueden ser simples células o series de células fusionadas, ambas clases producen frecuentemente sistemas complejos con crecimiento en estructuras parecidas a tubos, en las cuales es muy problemático reconocer los límites de células individuales. El término laticífero, por lo tanto parece más útil si se aplica a una sola célula o a una estructura resultante de la fusión de células. Un laticífero unicelular puede ser calificado, con base en su origen, como laticífero simple o no articulado, y la estructura derivada de la unión de células como laticífero compuesto o articulado (De Bary, 1877) cit. por Fahn, 1979).

Algunos de los laticíferos articulados consisten en cadenas de largas células o tubos compuestos no conectados entre sí lateralmente; otros se anastomosan lateralmente con tubos o cadenas celulares similares, todo combinado en una estructura de red o retículo. Estas dos formas de laticíferos se les denomina no anastomosados y anastomosados respectivamente.

Como ya se ha mencionado, diferentes formas de laticíferos no articulados existen, y en ciertas plantas maduras, células laticíferas pueden desarrollarse en sistemas muy grandes que se extienden a través de los diferentes tejidos de la raíz y el tallo.

Los laticíferos varían ampliamente en su estructura y el látex en su composición. El látex puede estar presente en células parenquimatosas ordinarias, como en el guayule (Parthenium argentatum Boner y Galston 1947; cit. por Esau, 1965), o puede estar formado en sistemas o tubos ramificados (Euphorbia), o anastomosados (Hevea). Las células parenquimatosas ordinarias con látex, y los sistemas laticíferos elaborados se intergradan uno con otro a través de grupos intermedios de estructuras de varios grados de especialización morfológica.

Los laticíferos también se relacionan con ciertos idioblastos que contienen taninos, mucílagos y compuestos protéicos. La situación es más complicada por la presencia de canales esquizogénicos conteniendo látex (Kisser, 1958; cit. por Esau, 1965). Así, los laticíferos no pueden delimitarse fácilmente.

Sin embargo, el látex puede estar presente también en células parenquimatosas no especializadas.

Los laticíferos están presentes en aproximadamente 12500 especies de 900 géneros, pertenecientes a cerca de 20 familias (Van Die, 1955; cit. por Esau, 1965; Metcalfe, 1966; cit. por Fahn, 1979). Estas pertenecen en su mayoría a las Dicotiledoneas, pero los laticíferos han sido encontrados también en algunas familias de Monocotiledoneas. Laboriau (1952; cit. por Esau, 1965), observó laticíferos en el género Regnellidium de la familia Marsiliaceae (Pteridophyta). Las células secretoras (diferentes de aquellas de los ductos resiníferos) presentes en las coníferas son también consideradas laticíferos (Werker, 1970; cit. por Fahn, 1979). Las plantas con látex incluyen desde plantas pequeñas herbáceas anuales como la Euphorbia, a grandes árboles como Hevea. El hecho de que los laticíferos estén restringidos a un pequeño número de familias, y que en algunas de las cuales

no hay evidencia de relación taxonómica cercana, sugiere que la capacidad de producir látex ha evolucionado más de una vez (Metcalfe, 1966; cit. por Fahn, 1979). Scharffstein (1932; cit. por Esau, 1965), y Rosowski (1968; cit. por Fahn, 1979), quienes trabajaron en algunas especies de Euphorbia, dijeron que su sistema laticífero completo es derivado de los pocos inicios que están ya presentes en el embrión. Mahlberg (1961; cit. por Esau, 1965), encontró en Nerium que el número inicial es constante y que pueden ser distinguidos en el embrión donde se presentan en el nodo cotiledonario donde se mandan haces hacia los cotiledones, el hipócotilo y la radícula. En el curso de desarrollo de ciertas especies de Euphorbia, las células laticíferas se encuentran en la circunferencia del cilindro central y se ramifican en las hojas y médula.

Mahlberg y Sabherwal (1967; cit. por Fahn, 1979), encontraron que en el desarrollo del embrión de Euphorbia marginata, aparecen etapas sucesivas de mitosis en el núcleo de los laticíferos y que el estímulo mitótico no comienza simultáneamente en todos ellos.

Ejemplos de los varios tipos de laticíferos se han encontrado en las siguientes familias y géneros.

Articulados anastomosados: Compositae, tribu Cichoriceae (Cichorium, Lactuca, Scorzonera, Sonchus, Taraxacum, Tragopogon); Campanulaceae, incluyendo la Lobeliodeae; Caricaceae (Carica papaya); Papaveraceae (Papaver, Argemone); Euphorbiaceae (Hevea, Manihot). Articulados no anastomosados: Convolvulaceae (Ipomoea, Convolvulus, Dichondra); etc. (Fhan, 1974).

COMPOSICION QUIMICA DEL LATEX.

El látex es una suspensión de muchas partículas pequeñas en un líquido con un índice de refracción variable.

El látex es una suspensión, o en ciertos casos, una emulsión, la composición química es la que difiere entre las especies. Entre el material suspendido se encuentran partículas de polímeros (metil - butadieno), ceras, resinas, proteínas, aceites esenciales, mucílagos y en ciertas especies de Euphorbia, algunos granos de almidón. El látex también contiene sales, ácidos orgánicos y otras sustancias en solución natural. Algunas plantas contienen en el látex, azúcares (Compositae), taninos (Musa), alcaloides (Papaver somniferum), y en Carica [®] papaya, está presente una enzima proteolítica, la papaína. El color del látex varía, puede ser blanco y lechoso (Euphorbia, Lactuca, Asclepias), amarillo-café (Cannabis), amarillo-anaranjado (Papaver), o incoloro (Mirus).

CITOLOGIA.

Los laticíferos mantienen un protoplasto vivo, el núcleo permanece en el protoplasto hasta la maduración de los elementos y el citoplasma se presenta como una capa parietal conteniendo el látex. En laticíferos no articulados el núcleo resulta de una serie de divisiones en una condición cenocítica (Mahlberg, 1959; cit. por Esau, 1965). Sperlich, en 1939, menciona que en los laticíferos articulados, en los cuales las comunicaciones están establecidas entre células individuales, son también multinucleadas pero aparentemente sólo porque los protoplastos se fusionan y no por una división subsecuente del núcleo. En laticíferos jóvenes el núcleo es fácilmente reconocible. Hay reportes de que el núcleo degenera en laticíferos maduros (Milanez, 1946 y 1949; cit. por Esau, 1965).

De acuerdo con Milanez (op. cit.), las pequeñas vacuolas de los laticíferos jóvenes de Hevea y Manihot son absorbidas por el citoplasma en vez de fusionarse en una vacuola mayor. Tal desarrollo implica que en los laticíferos maduros, el citoplasma es altamente hidratado y el látex es parte de este citoplasma.

Las paredes de los laticíferos no son lignificadas y aparentemente plásticas (Sperlich, 1939; Milanez, 1946; cit. por Esau, 1965). Pueden no ser más gruesas que las paredes de las células parenquimatosas adyacentes, o pueden serlo notoriamente. Las paredes incrementan frecuentemente su grosor con la edad del individuo. En 1959, Moor menciona que las paredes gruesas están altamente hidratadas y contienen celulosa y una alta proporción de sustancias pécticas y hemicelulosas (Esau, 1965).

ULTRAESTRUCTURA.

Un gran avance en cuanto al estudio de la estructura y cambios celulares en los laticíferos, se logró al aplicarse la microscopía electrónica.

Heinrich (1967, 1970; cit. por Fahn, 1979), quien estudió los laticíferos de Taraxacum bicorne y Ficus elastica con la ayuda del microscopio electrónico, expresó que las partículas de goma son sintetizadas en el citoplasma y no en los plástidos como se pensaba antes (Frey-Wyssling, op. cit.). En Ficus las partículas de goma están rodeadas por una envoltura posiblemente de naturaleza membranosa. Como se ha visto en Taraxacum, las partículas permanecen en el citoplasma y se liberan sólo en laticíferos viejos, cuando el tonoplasto se desintegra.

Muchas vacuolas aparecen en los inicios de los laticíferos. Thureson- Klein (1970), quien estudió los laticíferos de Papaver somniferum, notó en el citoplasma la aparición de muchas vesículas con material denso que podía contener alcaloides.

En laticíferos muy jóvenes de Euphorbia marginata, Schulze (1967; cit. por Esau, 1965), encontró gotas de goma, primero en el citoplasma pero más tarde únicamente en vacuolas. En etapas de desarrollo posteriores, se forma una vacuola central grande rodeada por un tonoplasto. Las pequeñas vacuolas con partículas de goma se unen a la vacuola central que se llena más y más de goma. Un tonoplasto fue reportado también por Schnepf (1964; cit por Esau, 1965), presente en laticíferos maduros de Euphorbia pulcherrima. Schulze op. cit. concluyó que en los laticíferos articulados-ramificados maduros de Taraxacum, Papaver, y Hevea las partículas de goma aparecen como gotas individuales en el citoplasma, mientras que en los laticíferos no articulados de Euphorbia aparecen dentro de vacuolas centrales.

Estudios de Ficus y Taraxacum mostraron que en el citoplasma de laticíferos en desarrollo están presentes un retículo endoplásmico relativamente bien desarrollado y muchos ribosomas. Las mitocondrias son pequeñas y degeneran

cuando las partículas empiezan a aparecer. Los dictiosomas aparecen sólo en las porciones en crecimiento de los laticíferos. En los laticíferos viejos la desintegración de los organelos, como se ha visto en Taraxacum, procede de la siguiente manera: cuerpos de Golgi, ribosomas y mitocondria, retículo endoplásmico y plástidos. En 1970, Heinrich registra en Ficus que la actividad mitótica del núcleo parece estar confinada a las zonas apicales (Fahn, 1979).

Nessler y Mahlberg (1977), describen la ontogenia en laticíferos de Papaver somniferum y presentan evidencia citoquímica sobre el origen del látex en el retículo endoplásmico. Concluyen que el proceso de perforación de la pared de los laticíferos lo llevan al cabo enzimas degradadoras de pared (celulasas), más que la presión que pueda ejercer el látex.

Nessler y Mahlberg (1978), examinan laticíferos de Papaver bracteatum y descubren que la diferenciación se lleva al cabo en el procambium de la radícula, encontrándose asociados con el floema después de 72 hrs. de sembradas las semillas, detectándolos por formación de vacuolas dentro del tonoplasto.

TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LATICIFEROS.

Se han trabajado dos técnicas principalmente: la inclusión en parafina y la inclusión en resinas. En ambas se han experimentado distintos tipos de tinciones, así como su observación en microscopía de campo claro y fluorescencia, teniendo la ventaja con las resinas de poder obtener material para microscopía electrónica.

De los primeros registros respecto al estudio de los laticíferos se encuentran los de De Bary de 1877 (Fahn, 1979), De Bary en 1884 (Fahn, *op. cit.*), y trabajos más específicos para vegetales se publican por Conn (1936).

La microscopía de fluorescencia se ha usado para realizar numerosos estudios de la estructura vegetal (Kleiny Linser 1930; Luhan, 1947), no obstante, el uso de la microscopía de fluorescencia no es mencionada ni en Johansen (1940), ni en Sass (1958), los manuales más completos en inglés de microtécnicas vegetales en general (O' Brien, 1981).

En cuanto a la aplicación de la microscopía de fluorescencia al estudio de los vegetales se registran los resultados obtenidos para tricomas con fluorescencia en azul claro intenso, esporangios en helachos con fluorescencia en café- dorado. (Needham, 1958).

Para cortes de vegetales sin teñir, en fresco, o incluidos en parafina se registra lo siguiente: vasos, en blanco azulado, células de floema, en café-amarillo y células epidérmicas en crema.

Para cortes de vegetales sin teñir, montados en seco o en un medio no fluorescente, se ha observado la siguiente diferencia en fluorescencia: células de madera y punteaduras en amarillo claro, médula y radios en amarillo, y ductos resiníferos en amarillo-verdoso intenso. (Needham, 1958).

La fluorescencia es producida por una variedad de componentes celulares (celulosa, calosa, polisacáridos carboxilados, glucanos, lignina y pectinas. (Clark, 1981).

Otro tipo de estudios, también hechos con apoyo de la microscopía de fluorescencia, han sido sobre el polen y su acción enzimática durante la polinización. (Healop-Harrison 1970; Kho, 1971).

Se tienen además, registros de fluorescencia primaria en plantas, por sustancias tales como carotenos, clorofila y ciertos alcaloides. (Hughes, 1975).

Inclusión en resinas y microscopía electrónica de transmisión.

Bruni (1978), describe la anatomía, morfología y topografía de laticíferos en embriones maduros de Euphorbia marginata, usando microscopía de fluorescencia y convencional (campo claro), y utilizando el mismo tipo de medio de inclusión para microscopía electrónica, las resinas.

En 1980, Bruni y Tosi, dan a conocer un método para la localización de laticíferos embrionarios por microscopía de fluorescencia y convencional, utilizando como medio de inclusión el butil-metil- metacrilato (resina).

El trabajo realizado por Bruni y Tosi (1980) fue en semillas de Euphorbia marginata, pero por las ventajas de la técnica, se utilizó como patrón para el presente estudio.

Las resinas acrílicas se utilizaron primeramente para embeber especímenes grandes para museos (Hibben, 1937), la más utilizada fue el metil-metacrilato.

En 1949, Newman, Borysko y Swerdlow, utilizaron el n-butil- metacrilato como medio de inclusión para microscopía electrónica.

Entre otras ventajas, la inclusión con metacrilatos produce cortes transparentes, de textura cerrada,

modificables en dureza por combinación de plásticos y la obtención de cortes que pueden ser de .6 a 5 micra, más delgados que con otros medios de inclusión tales como la parafina (Thompson, 1966).

Otros trabajos más recientes sobre el estudio de laticíferos han sido los realizados por Wilson y Mahlberg (1980), que con la ayuda de la microscopía electrónica revelan que el protoplasto de un laticífero maduro de Asclepias syriaca tiene una gran vacuola central con una membrana vacuolar intacta. La formación de esta vacuola aparentemente resulta de la dilatación y subsecuente alargamiento del retículo endoplásmico y probablemente en parte por fusión de vacuolas mas pequeñas.

Nessler (1982), registra la ultraestructura de laticíferos en plántulas de Glaucium flavum (Papaveraceae), caracterizada por la proliferación de numerosas vesículas así como la dilatación del retículo endoplásmico. La detección fue hecha con microscopía electrónica.

En 1986, Spilatro y Mahlberg publican un trabajo en el que relacionan la acumulación de almidón en el látex con el crecimiento de laticíferos de hojas en desarrollo de Euphorbia pulcherrima.

FLUORESCENCIA. La capacidad de un material para absorber luz de una frecuencia y reemitirla en una longitud de onda mayor o de menor energía se le denomina fluorescencia. En tal caso el sujeto observado modifica la longitud de onda excitadora, y la transmite en una longitud de onda visible (Holz, 1975).

A la fluorescencia que se presenta en forma natural se le llama fluorescencia primaria. La mayoría de los materiales orgánicos presentan esta propiedad, sin embargo se puede inducir un tipo específico de fluorescencia con marcadores. A este tipo de fluorescencia se le llama secundaria, y a la sustancia aplicada o colorante se le llama fluorocromo.

La brillantez de la fluorescencia depende principalmente de tres factores: (1) la eficiencia con la cual la sustancia convierte la luz incidente en radiación fluorescente; (2) la concentración del material fluorescente y (3) la intensidad de la radiación excitante. Para evidenciar correctamente la fluorescencia debe delimitarse claramente la banda de excitación con un filtro coloreado (Goldman, 1968).

A principios de siglo, en 1904, Köhler descubrió la posibilidad de localizar compuestos fluorescentes en cortes de tejidos vistos con microscopio.

Zeiss y Reichert llevaron al mercado los primeros microscopios alrededor de 1913 (Schneider-Zimmerman 1922, citado por O'Brien 1981). En las siguientes dos décadas algunos investigadores localizaron fluorescencia tanto en tejidos vegetales como animales (Ellinger, 1940, citado por O'Brien, 1981).

Sin embargo fue Hatinger (1959), el responsable de refinar la técnica y establecer su uso. Como resultado, la microscopía de fluorescencia se ha usado para un gran número de estudios en la estructura vegetal (Klein y Linser 1930; Luhan 1947; citados por O'Brien 1981).

Familia Convolvulaceae.

La familia Convolvulaceae tiene cerca de 50 géneros, con aproximadamente 2000 spp. tropicales y subtropicales. Ipomoea es el género más abundante con 400 spp. aproximadamente, del tipo de las enredaderas.

Algunas características de la familia son : presencia de látex, haces vasculares bicolaterales, corola plegada, óvulos erectos séiles, de placentación axilar y cotiledones doblados. (Standley y Williams, 1970; Cronquist, 1981; Wilson, 1960; citados por Ponce, 1986).

El nombre de Ipomoea proviene del griego *ips*= gusano y *homios*= parecido al referente al hábito de torcerse. El género está dividido en 8 secciones con base en la disposición de la inflorescencia, características de la flor y de la semilla (Wilson, 1960).

La mayoría de las especies están en regiones tropicales de América del Sur, América Central y México, Sur de Estados Unidos y pocas en Canadá.

El género en México, ha sido estudiado por Matuda, Austin y Pedraza entre otros (Standley y Williams, 1970; Wilson, 1960; Pedraza 1983; citados por Ponce, 1986).

En la familia Convolvulaceae Fhan (1974), observó la presencia de laticíferos articulados no anastomosados en tallos y hojas de Convolvulus, Ipomoea y Dichondra.

Con base en la literatura consultada se consideró pertinente abordar este estudio puesto que no se encontró dato alguno sobre investigaciones realizadas en semillas de Convolvulaceas.

Se escogió la semilla de Ipomoea purpurea porque la presencia de látex es obvia en la planta adulta y por el probable papel que los laticíferos puedan representar como una más de las adecuaciones de esta planta como maleza.

MATERIAL Y METODO

Se utilizó un lote de semillas maduras deshidratadas de Ipomoea purpurea (colectadas en el Municipio de Miraflores, Edo. de Mex. en Octubre de 1986). Se escarificaron y se pusieron a germinar en cajas de Petri con círculos de papel humedecidos con agua. Una vez germinadas se sembraron en macetas y estas se colocaron al aire libre.

Se esperó hasta la floración anotando los datos sobre el número de flores producido, fecha de antésis de cada flor y fecha de corte. Se siguió el desarrollo de los frutos desde el momento de la floración (antésis, día 0), hasta el fruto maduro hidratado (día 30), se colectó cada estadio con 24 hrs. de diferencia. Por cada estadio se colectaron 6 muestras de diferentes individuos y el total de estadios fueron 30.

El material colectado se fijó en FAA durante 24 hrs. al menos, lavándolo posteriormente con agua corriente para quitar el exceso de fijador.

Se procedió a deshidratar con soluciones graduales de alcohol etílico al 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%.

Una vez deshidratadas las muestras se incluyeron en metacrilatos.

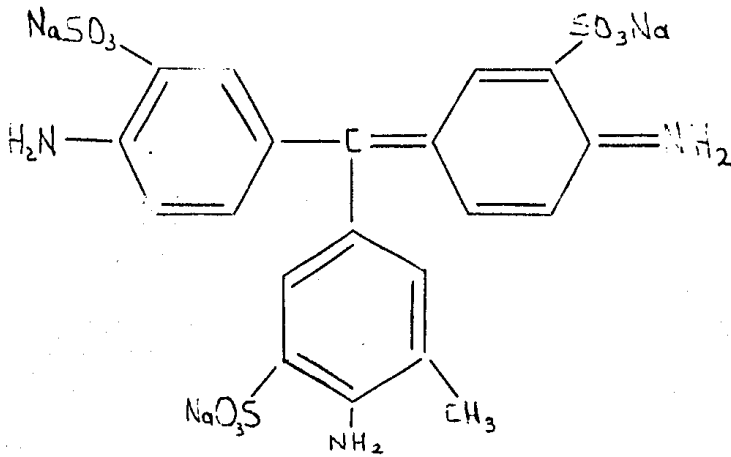
La inclusión se hizo de la siguiente manera:

- a) Alcohol absoluto-butil metil metacrilato (1:1)
24 Hrs.
- b) Butil- metil metacrilato (7:3) 24 Hrs.
- c) Butil- metil metacrilato (7:3) 24 Hrs.
- d) Butil- metil metacrilato con catalizador 24 Hrs.
- e) Butil- metil metacrilato con catalizador a 50 ° C
24 Hrs.

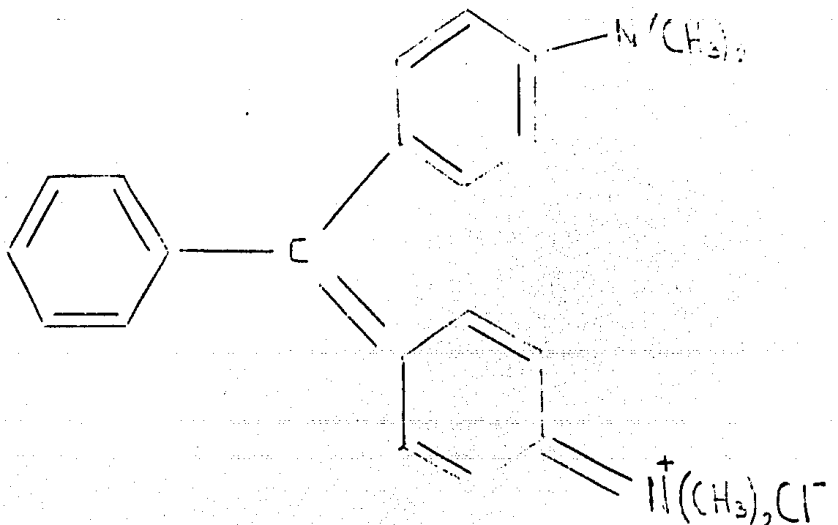
Posteriormente se obtuvieron cortes con navajas de vidrio de 2 a 6 micra utilizando un ultramicrotomo SORVALL MT2-B y se fijaron por calentamiento a los portaobjetos.

Para la tinción se utilizó la técnica de Pianese, (1896); citada por Bruni, (1980) modificada por Alva-Centeno, (en preparación).

La técnica incluye el uso de dos colorantes, la fucsina ácida y el verde de malaquita. El primero es un compuesto con peso molecular de 585.54, su absorción máxima es de 540 a 545 nm, y su fórmula es: (Windholz 1976).



El verde de malaquita es un colorante básico, su peso molecular es 364.90, su absorción máxima es de 616.9 nm, y su fórmula es: (Windholz, 1976).



El procedimiento de tinción fue el siguiente:

- a) Hidratación de los cortes 30 seg.
- b) Tinción con verde de malaquita al 1% (ac.) 30 seg.
- c) Lavado con agua destilada , hasta quitar el exceso de colorante.
- d) Tinción con fucsina ácida al 1% (ac.) 30 seg
- e) Lavado con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.

Para la observación de los cortes se utilizó un fotomicroscopio Zeiss II con objetivos Neufliuar, de 2.5X 6.3X, 10X, 25X, 40X y 100X, como fuente de luz una lámpara de 50 Watts de arco de mercurio de alta presión. Se utilizaron los siguientes juegos o sistemas de filtros:

JUEGO	FILTRO EXITADOR	FILTRO SEPARADOR DE HAZ	FILTRO DE BANDA DE PASO
SIST I	G 365	FT 335	LP 420
SIST II	400/440	FT 460	LP 470
SIST III	450/490	FT 510	LP 520
SIST IV	510/560	FT 580	LP 590

contenidos en el microscopio, así como iluminación convencional de campo claro.

En la fig. 1 se representan gráficamente los juegos de filtros utilizados para el análisis de los cortes, así como las bandas de excitación y de transmisión de cada uno de ellos.

Se observaron cortes sin teñir, teñidos con fucsina acida, teñidos con verde de malaquita, y teñidos con fucsina acida-verde de malaquita.

Las fotografías de los cortes se tomaron en un fotomicroscopio Zeiss II, y con película Ektachrome ASA 100.

Fig. 1.- Representación gráfica de los juegos o sistemas de filtros utilizados para el análisis de los cortes, con microscopía de fluorescencia. (T) Transmisión, () Longitud de onda. () Filtro excitador, () Filtro separador de haz, () Filtro de banda de paso.

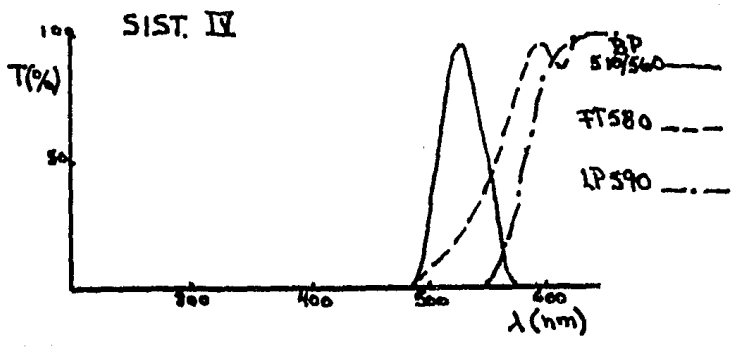
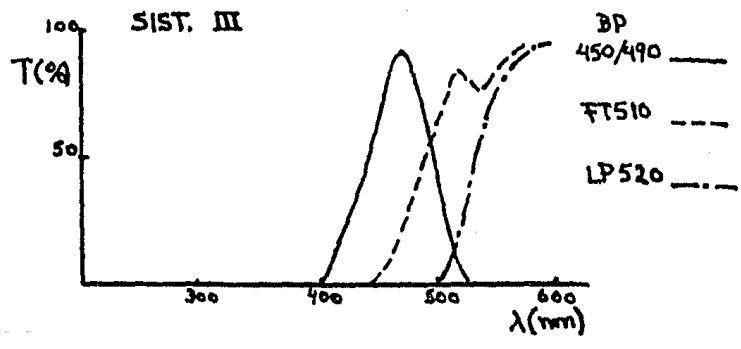
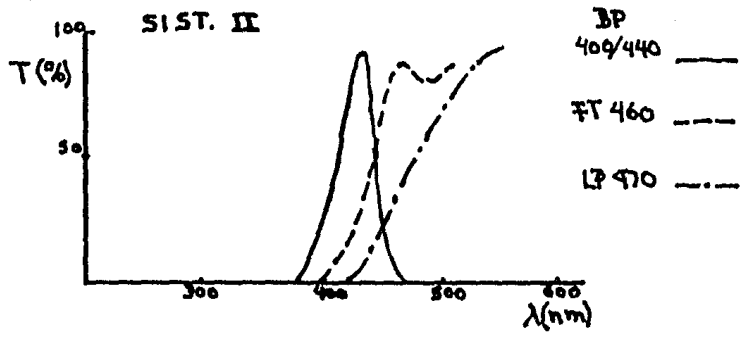
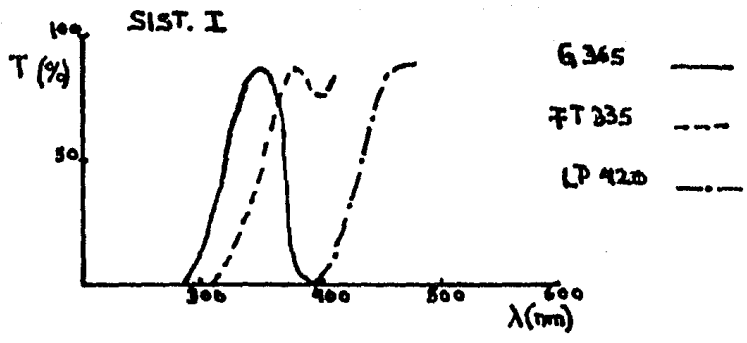


Fig. 1

RESULTADOS

Ciclo de vida de Ipomoea purpurea.

El ciclo biológico de I. purpurea en condiciones ambientales (Marzo a Junio de 1987), fue el siguiente: De la germinación de la semilla al establecimiento de la plántula fueron 8 días en promedio.

Desde la plántula al inicio de la floración, 22 días aproximadamente.

El tiempo desde la antésis hasta la producción de frutos maduros hidratados fue de 30 días en promedio.

El criterio que se utilizó para determinar que una semilla estaba madura fue cuando el fruto tuvo los primeros signos de deshidratación, los cuales pueden detectarse a simple vista por el cambio de coloración en el pericarpio de verde claro a café.

Tiempo de aparición de los laticíferos.

Se procesaron 150 muestras correspondientes a cada uno de los 30 días de desarrollo de la semilla de I. purpurea hasta su inclusión en metacrilatos (n-butil metil). Es decir que se procesaron 5 muestras por cada día de desarrollo.

Cada muestra obtenida se observó al microscopio de campo claro para la localización del embrión.

El embrión en su etapa globular se hace aparente hacia el día 18 de desarrollo. En esta etapa no se observaron estructuras que pudiesen ser las células precursoras de los laticíferos (Fig.2). Todas las células del embrión tienen las mismas características morfológicas.

En los cortes correspondientes a los días 19 y 20 de desarrollo tampoco se observaron estructuras que pudieran corresponder a laticíferos.

Es a partir del día 21 en el que se empiezan a observar los laticíferos (Fig. 3).

Ontogenia de los laticíferos.

Las células del tejido cotiledonario que darán origen a los laticíferos comienzan a aumentar su volumen, observándose mas grandes que las células parenquimatosas adyacentes.

Al microscopio de campo claro y teñidas con azul de toluidina se observan células hipertrofiadas con el núcleo grande (6 micra) y muy teñido. Con la doble tinción fucsina acida- verde de malaquita se observa el citoplasma de las células laticíferas teñido de rojo pálido, contrastando con el verde de las paredes celulares. El tejido parenquimatoso

adyacente se tinte de manera uniforme de color verde pálido. Esta diferencia en coloración hace que las células laticíferas resalten de su entorno.

A partir de este momento, día 19, los laticíferos irán diferenciándose unos y surgiendo otros de novo hasta la maduración de las semillas. Los laticíferos maduros se encontraron a partir del día 26 de desarrollo.

Estructura celular de los laticíferos.

Es pertinente aclarar que los laticíferos en el embrión de I. purpurea sólo se desarrollan en los cotiledones, en el eje embrionario no se observaron laticíferos. (Fig. 4). El laticífero, en este caso, es unicelular y esférico, ésto se demuestra porque los cortes realizados en cualquier plano siempre dan la imagen de un círculo.

El laticífero surge como una célula que comienza a aumentar su volumen y a diferenciarse de su entorno por un mayor tamaño (Fig. 5).

Conforme aumenta el volumen aumenta el grosor de la pared celular, días 24-25 y se puede observar la formación de una vacuola central; muy pequeña al principio y que crece gradualmente desplazando al núcleo hacia la periferia de la célula (Figs. 6, 6a, y 6b).

La vacuola llega a alcanzar prácticamente todo el volumen celular. El núcleo y el citoplasma empiezan a desintegrarse (Fig. 7). El estado final en el desarrollo del laticífero corresponde a una célula de 60 a 120 micra sin organelos celulares visibles al microscopio óptico, con una gran vacuola central conteniendo algunas formaciones reticulares (Fig. 8). Apparently no hay ninguna conexión de los laticíferos con el sistema vascular (Fig. 9).

Resultados con microscopía de fluorescencia.

Al igual que con la microscopía de campo claro los laticíferos se hacen evidentes para el día 21, las muestras teñidas con la doble tinción fucsina acida-verde de malaquita se observaron con los cuatro sistemas de filtros, siendo el sistema III, el más eficiente para la detección de los laticíferos. Estos presentan una fluorescencia no específica, pero sí más intensa que aquella de las células adyacentes. El citoplasma presenta una fluorescencia anaranjada, contrastando con la ausencia de fluorescencia del núcleo (Fig. 10).

Con el sistema II se pudo observar el tejido provascular en formación, permitiendo comparar la diferencia morfológica y de organización tisular con aquella de los laticíferos.

Con el sistema IV, no se obtuvo fluorescencia específica como la obtenida con el sistema III.

Para el día 26, el engrosamiento de la pared celular se hace evidente con las preparaciones sin teñir y su observación con los sistemas II y IV, presentando una fluorescencia verde y roja respectivamente.

Las preparaciones con doble tinción y observadas con el sistema II permitieron la fácil detección de la pared (fluorescencia amarillo- naranja), y la delimitación del laticífero (Fig. 11).

Los ejemplares control, sin teñir, salvo por la delimitación de la pared, mostraron sólo una débil fluorescencia amarillo verdoso del citoplasma.

Las preparaciones teñidas con fucsina ácida, aunque emitieron fluorescencia, fueron menos contrastadas, que las que utilizaron doble tinción.

Las preparaciones con verde de malaquita no presentaron fluorescencia alguna. Con el sistema I, no se obtuvo imágenes o no se detectó información diferente a la descrita anteriormente.

Fig. 2 .- Fotomicrografía del embrión en etapa globular de desarrollo (día 18). (CE) Cuerpo del Embrión. (S) Suspensor . Azul de toluidina. 160 X a la película. Campo claro. Escala de reproducción 2.5:1.

Fig. 3.- Fotomicrografía del embrión en corte tangencial (cotiledón). Día 21 de su etapa de desarrollo. (L) Laticíferos. Fucsina ácida- Verde de malaquita. 40 X a la película. Campo claro. Escala de reproducción 2.4:1.

Fig. 4.- Fotomicrografía del embrión en corte tangencial, día 30 de desarrollo, mostrando la localización de los laticíferos (L) sólo en los cotiledones (Co). (E) Eje embrionario. Azul de toluidina. Campo claro. 25.2 X a la película. Escala de reproducción 3:1.

Fig. 5 .- Fotomicrografía de una célula laticífera en diferenciación, día 21 de desarrollo. (V) Vacuola, (C) Citoplasma, (N) Núcleo. Fucsina ácida- Verde de malaquita. Campo claro. 400 X a la película. Escala de reproducción 3:1.

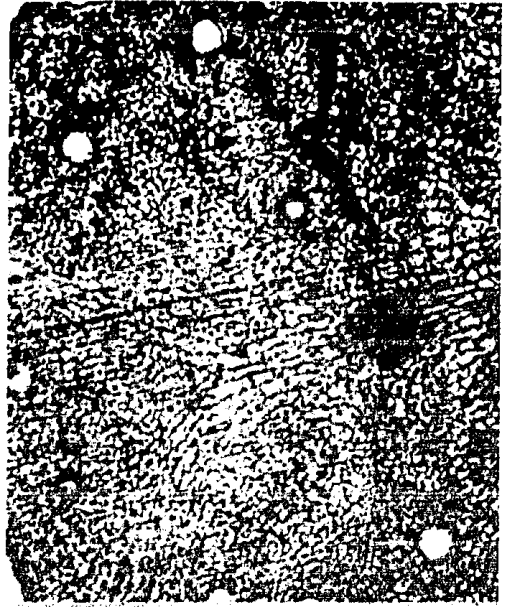
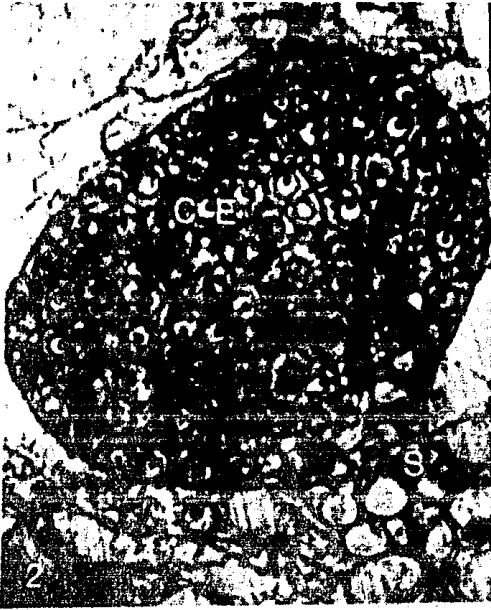


Fig. 6.- Fotomicrografía de una célula laticífera , día 22 de desarrollo. (V) Vacuola, y (N) Núcleo. Fucsina ácida- Verde de malaquita. Campo claro . 160 X a la película. Escala de reproducción 9.5:1.

Fig. 6a.- Fotomicrografía de una célula laticífera, día 24 de desarrollo. La vacuola (V), desplaza al núcleo (N) hacia la periferia de la célula. Nótese el grosor de la pared celular (Pc). Fucsina ácida- Verde de malaquita. Contraste de fases. 160 X a la película. Escala de reproducción 3:1.

Fig: 6b.- Fotomicrografía de una célula laticífera, día 26, donde se aprecia que la vacuola (V) ha desplazado al núcleo (N) casi por completo hacia la pared celular (Pc). Fucsina ácida- Verde de malaquita. 160 X a la película. Escala de reproducción 8:1.

Fig. 7 .- Fotomicrografía de un laticífero (L), día 26 con restos de citoplasma (C), y la vacuola (V) que ocupa casi la totalidad de la célula. En la parte inferior un laticífero más joven. (N) Núcleo. Fucsina ácida- Verde de malaquita. Campo claro. 100 X a la película. Escala de reproducción 7.5:1.

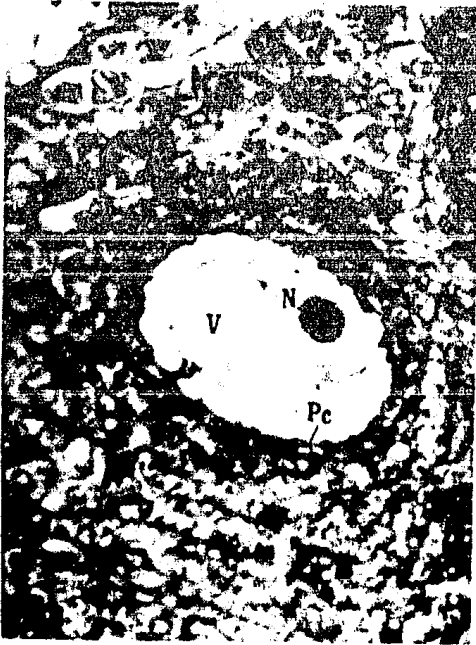
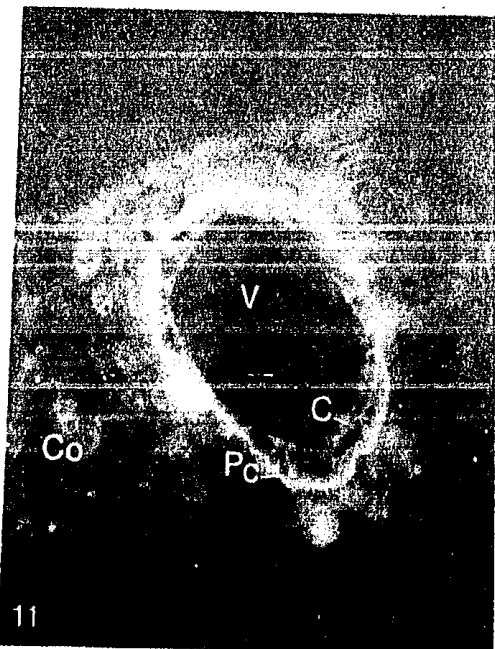
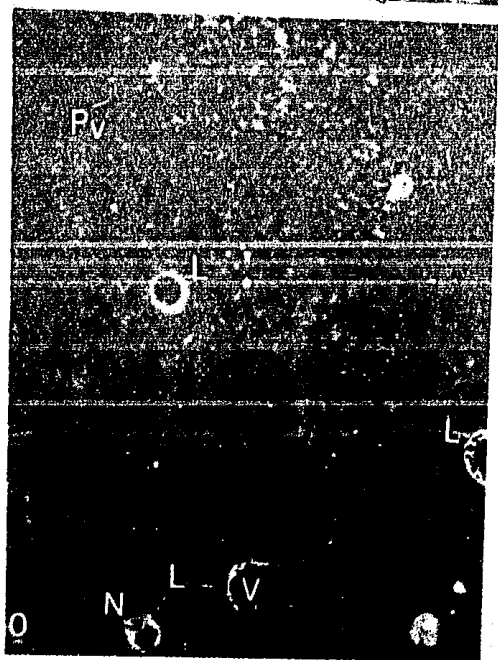
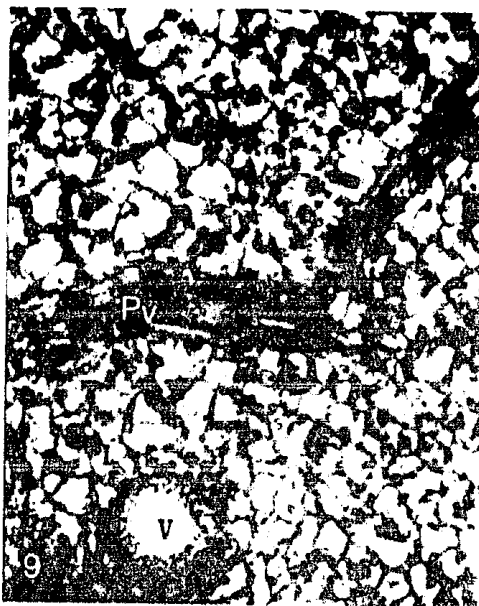
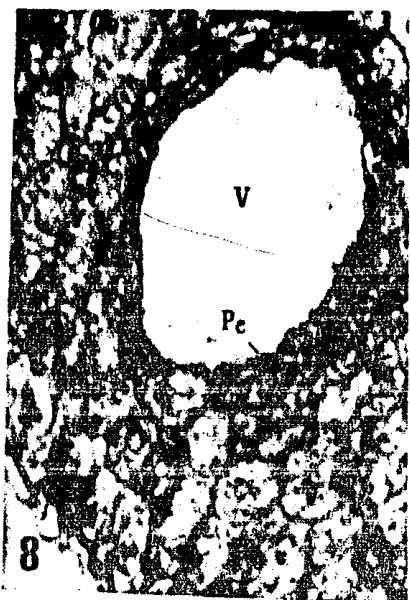


Fig. 8 .- Fotomicrografía de un laticífero maduro, día 30. El citoplasma y el núcleo han desaparecido, quedando el espacio ocupado por una gran vacuola (V) de 120 micra de diámetro mayor. (Pc) Pared celular, (Co) Cotiledón. Fucsina ácida- Verde de malaquita. Campo claro. 160 X a la película. Escala de reproducción 5.8:1.

Fig. 9 .- Fotomicrografía donde se aprecia la localización de un laticífero con respecto al tejido provascular (Pv). No se aprecia relación entre el tejido provascular y los laticíferos. (C) Citoplasma, (V) Vacuola. Fucsina ácida- Verde de malaquita. Campo claro. 100 X a la película. Escala de reproducción 7:1.

Fig. 10 .- Fotomicrografía de fluorescencia, mostrando a los laticíferos (L). Nótese el contraste con su núcleo (N), y el tejido provascular (Pv). Fucsina ácida- Verde de malaquita. SIST. III Epi-Illuminación. 40 X a la película. Escala de reproducción 4:1.

Fig. 11 .- Fotomicrografía de fluorescencia mostrando la pared celular (Pc), así como su tamaño (90 micra), en comparación con el grosor del cotiledón (Co). (V) Vacuola, (C) Citoplasma. Fucsina ácida- Verde de malaquita SIST. II Epi-Illuminación. 160 X a la película. Escala de reproducción 4.4:1.



DISCUSION.

Los laticíferos son estructuras vegetales conocidas desde hace tiempo, aunque relativamente poco estudiadas en cuanto al número de especies que los presentan. Esto se debe a que la atención de los investigadores se centró en los laticíferos de aquellas especies cuyo látex posee un valor comercial, como los mundialmente conocidos trabajos sobre Hevea brasilensis, planta de donde se obtiene el caucho tan importante en diversas industrias del hule.

Los estudios realizados sobre los laticíferos han tenido diversos enfoques: el químico, relacionado con la composición del látex; el taxonómico, relacionando su presencia con los diferentes taxa y el ontogénico, que como su nombre lo indica describe el desarrollo y la forma final de los laticíferos en las especies trabajadas.

Los órganos de las plantas mas estudiados con respecto a los laticíferos son los tallos, las hojas y las raíces. Se tienen pocos reportes en semillas y de muy contadas familias, entre ellas destacan las Euphobiaceae, Papaveraceae, Asclepiadaceae y Compositae.

Fhan (1974), menciona la presencia de laticíferos articulados no anastomosados para los géneros Ipomoea,

Convolvulus y *Dichondra*, de la familia *Convolvulaceae*, y Cronquist (1981), ya incluye la presencia del látex como un carácter diagnóstico de la familia.

La presencia de látex (en este caso como un líquido lechoso) es obvia en el tallo, hojas y raíces de muchas especies de *convolvulaceas*, y de su estudio se han generado varios trabajos.

Sin embargo, no se tiene conocimientos de estudios de laticíferos en semillas de esta familia. Su presencia ha sido mencionada colateralmente en algunos trabajos de anatomía.

Así, se cree que este trabajo es el primero que se realiza en semillas de *Convolvulaceae*.

Durante la ontogenia de la semilla se hizo evidente que a partir del día 21 del desarrollo, en los cotiledones del embrión empiezan a diferenciarse las células que darán origen a los laticíferos, y el embrión maduro posee gran cantidad de estas estructuras pero exclusivamente en los cotiledones, nunca se presentan en el eje embrionario. Este hecho coincide con el reportado por López-Curto(1987), para *Ipomoea X leucantha*; por Ponce(1986), para *Ipomoea crinita*; por Murcio(1983), para *Ipomoea triloba* y por Andrade(Comunicación personal), para *Ipomoea thyriantina*.

Márquez-Guzmán(1986), registra la estructura de la semilla de Turbina corymbosa, donde no menciona la presencia de laticíferos.

Esto lleva a hacernos la siguiente reflexión: La presencia de laticíferos en semillas es un carácter de familia o sólo se presenta en ciertos géneros? Por los datos hasta ahora obtenidos parece ser que la presencia de laticíferos en los cotiledones del embrión es un carácter para el género Ipomoea, pero no para el género Turbina, ambos de la misma familia: la Convolvulaceae. Un estudio extensivo y sistemático al respecto nos dara la respuesta definitiva.

De Bary(1877), propone una clasificación para los laticíferos y los divide en articulados (pluricelulares), y no articulados (unicelulares). Siguiendo esta clasificación, los laticíferos de la semilla de Ipomoea purpurea serían no articulados (unicelulares). Su forma esférica se puso de manifiesto haciendo cortes en todos los planos y obteniendo siempre figuras circulares.

En cuanto a su estructura, Mahlberg(1959), registra en laticíferos no articulados una condición cenocítica, ésto, sin embargo, no se observó en ninguno de los estadios de I. purpurea. Mahlberg y Sabharwal(1967), encuentran en los laticíferos no articulados de Euphorbia

marginata estados sucesivos de mitosis, esto puede deberse a que por el crecimiento elongado de los laticíferos se vea incrementada la actividad nuclear y esta no termine sino hasta que se haya alcanzado la madurez, es decir que se complete su crecimiento y entonces degenera el núcleo.

Por otro lado se observó una hipertrofia nuclear en los laticíferos jóvenes de I. purpurea, degenerando posteriormente en los laticíferos maduros. Esto concuerda con los registros de Milanez en 1946 y 1949. (Esau, 1965).

El incremento frecuente en el grosor de las paredes de los laticíferos de I. purpurea, coincide con la observación hecha por Moor en 1959 (Esau, 1965).

En cuanto a la localización, no se encontraron laticíferos en el eje embrionario, sólo en los cotiledones. Esto contrasta con los estudios hechos en E. marginata y Nerium, donde se siguió el desarrollo de los laticíferos y se encontró que el surgimiento de éstos es a muy temprana edad de formación del embrión, además de que se extienden haces hacia el epicótilo y la radícula, manteniendo un número constante en la planta y dando origen a los laticíferos de la planta adulta. (Scharfstein, 1932; Rosowski, 1960; Mahlberg, 1961).

En I. purpurea los cotiledones son hojas efímeras que mueren un poco después de que aparecen las hojas

definitivas y no se ha observado relación de los laticíferos cotiledonarios con el resto de la plántula, por lo tanto, los laticíferos de la planta adulta deben de surgir de forma independiente.

En la literatura revisada no se encontró reporte alguno sobre laticíferos esféricos unicelulares como los que presenta *Ipomoea purpurea*.

En cuanto a la técnica empleada para la detección de laticíferos, se pudo observar que, los resultados con la microscopía de fluorescencia fueron positivos, sin embargo, esta técnica no ofreció ventajas respecto a la microscopía convencional de campo claro para resaltar las características morfológicas de los laticíferos.

En lo referente a la fluorescencia del citoplasma hubo diferencia con los resultados registrados por Bruni y Tosi (1980). Esto debido probablemente a que la composición química, así como la proporción de los compuestos del látex en *E. marginata* son diferentes a los de *I. purpurea*, es decir, que se obtuvo una respuesta distinta al ser expuestas a una misma longitud de onda excitadora.

El resultado en las observaciones hechas en campo claro para *E. marginata* no difieren de las obtenidas en el presente trabajo.

Es importante hacer notar que los colorantes utilizados no tienen un carácter específico por lo que no es posible determinar el compuesto o compuestos que inducen la fluorescencia directamente (Bruni y Tosi, 1980).

Un estudio citoquímico podría dar la clave para la caracterización de los compuestos del látex de la planta en estudio y buscar entonces un marcador específico para la detección de estos en pequeñas cantidades.

La clasificación propuesta por De Bary (1877), ha sido base para el reconocimiento de los laticíferos como articulados (pluricelulares) y como no articulados (unicelulares), aunque sin valor taxonómico hasta el momento.

Fhan(1974), hace mención a laticíferos para los géneros Convolvulus, Ipomoea y Dichondra de la familia Convolvulaceae y los describe como articulados no anastomosados, estudiados en tallo y hojas solamente, sin embargo, no menciona las citas bibliográficas de donde se obtuvo dicha información.

Así pues, la ontogenia y la estructura final de laticíferos esféricos unicelulares en los cotiledones del embrión de la semilla de I. purpurea, constituye el primer registro para esta familia.

CONCLUSIONES

1) Los laticíferos de I. purpurea son no articulados (unicelulares), esféricos y no anastomosados.

2) Aparecen entre los días 20 y 21 de desarrollo de la semilla, partiendo de la antésis como día cero.

3) El laticífero maduro tiene un diámetro aproximado de 60 a 120 micra, en comparación con sus células vecinas, cuyo diámetro es de 6 a 8 micra en promedio.

4) Los laticíferos se presentan solamente en los cotiledones del embrión y nunca en el eje embrionario.

5) La técnica de fluorescencia no presentó ventajas con respecto a la microscopía de campo claro, en la observación de los laticíferos.

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

Andrade, S. L. 1988. Comunicación personal. Fac. de Ciencias U.N.A.M.

Bruni, A. ; Dall'olio, G. y Mares, D. 1978. Use of fluorescent labeling methods in morphological and histochemical studies of latex "in situ". Abstracts of papers presented at the second meeting. The section of cytology of the Botanical Society of Italy.

Bruni, A. y Tosi, B. 1980. A method for localizing embrional laticifers by combined convencional and fluorescence microscopy. Protoplasma 102: 343-347.

Bruni, A. ; Vannini, G.L y Fasulo, M.P. 1978. Anatomy of the latex system in the dormant embryo of Euphorbia marginata Purch: Correlative analysis of the histological organization and topografic distribution of laticifers. Ann. Bot. 42: 1099-1108.

Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th. Ed. Williams & Wilkins. London. 432 pp.

Conn, H.J. 1953. *Biological Stains*. 6th Ed. Williams & Wilkins. London. 275 pp.

Cronquist, A. 1977. *Introducción a la Botánica*. Continental 2a. Ed. México. 848 pag.

Cronquist, A. 1981. *An intergrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, N.Y.

Esau, K. 1965. *Plant Anatomy*. 2a. Ed. Wiley, N.Y. 767 pp.

Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. 2a. Ed. Wiley, N.Y. 550pp.

Fhan, A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press. N. Y. 277 pp.

Goldman, M. 1968. *Fluorescent Antibody Methods*. Academic Press. London. 303 pp.

Heslop- Harrison, J; Heslop- Harrison, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hidrolisis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.* 45: 115-120.

- Hughes, J. E; McCully, M.E. 1975. An optical brightener for studies of plant structure by fluorescence microscopy. *Stain Technol.* 50: 319-329.
- Holz, H. M. 1975. Worthwhile facts about fluorescence microscopy. Carl Zeiss Co. Oberkochen. 47 pp.
- Kho, Y.O; Baer, J. 1971. Fluorescence microscopy in botanical research. *Zeiss Information* 76: 54-57.
- López-Curto, M. de L. 1987. Estudio del ciclo de vida y del desarrollo de la semilla de Ipomoea X leucantha (Convolvulaceae) contaminante del arroz comercial. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias U.N.A.M.
- Mahlberg, P. G.; Sabharwal, P. S. 1968. Origin and early development of nonarticulated laticifers in embryos of Euphorbia marginata. *Amer. J. Bot.* 55 (3): 375-381.
- Márquez-Guzmán, J. 1986. Anatomía e Histoquímica del desarrollo de la semilla de Turbina corimbosa (L.) Raf. Convolvulaceae. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

Mendez, R. I.; Namihira, G. D.; y Moreno, A. L. 1987. El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Ed. Trillas. México. 210 pp.

Murcio, G. E. 1983. Estudio anatómico y citoquímico de la semilla madura de Ipomoea triloba familia Convolvulacea. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias U.N.A.M.

Needham, H. G. 1958. The practical use of the microscope. Charles C. Thomas. Illinois. 493 pp.

Nessler, C. L.; Mahlberg, P. G. 1977. Cell wall perforation in laticifers of Papaver somniferum L. Bot. Gaz. 138 (4): 402-408.

Nessler, C. L. 1982. Ultrastructure of laticifers in seedlings of Glaucium flavum (papaveraceae). Can. J. Bot. 60: 561-567.

Nessler, C. L., Mahlberg, P. G. 1978. Laticifer ultrastructure and differentiation in seedlings of Papaver bracteatum Lindl., Population Arya II (Papaveraceae). Amer. J. Bot. 65 (9): 978-983.

- O'Brien, T. P., Mc Cully, M. E. 1981. The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcaphi Pty. Ltd. Melbourne, Australia. 174 pp.
- Ponce, Salazar, R. M. 1986. Estudio del desarrollo de la testa de Ipomoea criniticalyx (Convolvulaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Rosowski, J. R. 1968. Laticifer morphology in the mature stem and leaf of Euphorbia supina. Bot. Gaz. 129 (2): 113-120.
- Spilatro, S. R., Mahlberg, P. G. 1986. Latex and laticifer starch content of developing leaves of Euphorbia pulcherrima. Amer. J. Bot. 73(9): 1312-1318.
- Thompson, S. W. 1966. Selected histochemical and histopathological methods. Charles c. Thomas Publisher. Springfield Illinois, U.S.A.
- Thurson-Klein, A. 1970. Observation on the development and fine structure of the articulated laticifers of Papaver somniferum. Ann. Bot. 34: 751-9.

Wilson, K. J., Mahberg, P. G. 1980. Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed Asclepias cyriaca L. (Asclepidaceae). Amer. J. Bot. 67 (8): 1160-1170.

Windholz, M. and Editors. 1976. The Merck Index. An encycloperdia of chemicals and drugs. 9th Ed. Merck & Co., Inc. U.S.A.