

75
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE LA LINEA CLARA MEDIANTE
TECNICAS DE MICROSCOPIA FOTONICA
DURANTE EL DESARROLLO DE LA CUBIERTA
SEMINAL DE *Ipomoea purpurea*
(CONVOLVULACEAE)

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

HOMER ALFREDO GAMBOA ROMERO



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" DETECCIÓN DE LA LINEA CLARA MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA FOTÓNICA DURANTE
EL DESARROLLO DE LA CUBIERTA SEMINAL DE Ipomoea purpurea (Convolvulaceae) "

realizado por HOMER ALFREDO GAMBOA ROMERO

con número de cuenta 8119697-1 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

Propietario

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

Propietario

M. en C. ROSENDA MARGARITA PONCE SALAZAR

Suplente

M. en C. SONIA VAZQUEZ SANTANA

Suplente

BIOL. ANA IPARRI BIELE ANTONI
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A mi madre María Luisa Romero Tovar, por su esfuerzo tan grande, que me permitió llegar a la culminación de este trabajo.

A mi hermana Violeta y a mi cuñado Juan, por su forma de ser y por su apoyo en todo momento.

A mi mamá Lolita y a mis primos y sobrinos, Paty, Poncho, Alfredo, Paquita, Emmanuel, Miriam, Israel, Samara, por su cariño, apoyo y comprensión en todo momento.

A la familia Sánchez Vázquez por la amistad que me brindaron desde siempre.

A Lety por su infinito amor, amor, amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis Dra. Judith Márquez Guzmán por la oportunidad, apoyo y motivación para la realización de este trabajo.

A mi Codirector de tesis M. en C. Alejandro Martínez Mena por su valiosa ayuda y orientación en las técnicas de microscopía y fotografía, antes y durante la elaboración de este trabajo.

A la M. en C. Aurora Alcazar Pestaña por proporcionarme las semillas para la realización de esta tesis.

A la M. en C. Rosario Rodríguez Gullén por el tiempo y la asesoría en las técnicas de inclusión y tinción.

A mis sinodales M. en C. Sonia Vázquez Santana, M. en C. Margarita Ponce Salazar, Biol. Ana Isabel Bleler Antolín por la revisión y sugerencias que hicieron al trabajo.

Al Toño Hernández, por la tipografía, dibujos y edición de la tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Citología, Guillermo, Lulú, Guille, Wong, Citlali, Silvia, Sonia, Felipe, Clarita, Alicia, Ana Rivas, Enriqueta y Reyna por su ayuda y colaboración.

A mis compañeros del Laboratorio de Microcine y agregados culturales, Verena, Rólex, Fisiquito, Eva, Paco Soberón, Adrián Cerda, Tonchis, la Miss Anabel, Tío Alex, Félix, Laurita, Charli, nuestra esposa de Charli (Silvia), Pablo, Grandix, Archi, Lety y Yukiko.

A la QFB. Corita Ojesto y a todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio Central de Reactivos de la SSA por su apoyo constante en todo momento.

Y a quienes de una u otra manera participaron en la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Citología y Microcine de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por lo cual agradezco las facilidades del material y equipo para la realización de este trabajo.

La microscopía fotónica
como una técnica bien empleada no ha perdido
actualidad ya que sigue proporcionando a la
investigación datos de naturaleza cualitativa
y cuantitativa de incalculable valor
(Arredondo, J. A. y A. Martínez. 1978).

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
SISTEMAS OPTICOS Y DE ILUMINACION.....	17
OBJETIVOS	44
MATERIAL Y METODO.....	45
RESULTADOS	47
LAMINAS	51
CUADROS	62
DISCUSION	65
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75

RESUMEN

La semilla de *Ipomoea purpurea* en la madurez posee una testa dura e impermeable al agua, formada por cuatro capas: epidermis, subepidermis monoestratificada, esclerénquima en empalizada triestratificada y parénquima pluriestratificada. El primer estrato de escleridas adyacente a la subepidermis, presenta una línea clara (light line).

El propósito de este trabajo fue detectar la línea clara en cortes histológicos de la testa de *Ipomoea purpurea*, en 5 etapas diferentes de desarrollo, usando 2 técnicas de tinción: azul de toluidina, safranina-verde rápido y preparaciones sin teñir, observándose cada una de las preparaciones anteriores con diferentes técnicas de microscopía fotónica: microscopía de campo claro, microscopía de contraste de fases, microscopía de polarización y microscopía de contraste diferencial de interferencia (CDI) según Nomarski.

Durante el desarrollo de la semilla, la línea clara se detectó por primera vez en semilla madura hidratada. Para su observación la tinción más favorable fue la de azul de toluidina y la microscopía de campo claro, contraste de fases y Nomarski.

A partir de esta etapa y hasta semilla madura deshidratada la línea clara se fue haciendo más evidente. En cortes no teñidos sólo con CDI se detectó.

En semillas maduras deshidratadas se observó con cualquier técnica de tinción y de microscopía, sin embargo los mejores resultados fueron con CDI.

1. INTRODUCCION

Las semillas son una forma de supervivencia de Angiospermas y Gimnospermas. Son el vehículo que sirve para que la vida embrionaria, casi suspendida, renueve su desarrollo aún años después de que sus progenitores han muerto y desaparecido.

Entre las plantas, los grandes grupos que poseen semillas son: las Gimnospermas y las Angiospermas (Raven, *et al.*, 1986).

La semilla generalmente proviene de un óvulo fecundado y maduro. Está constituida fundamentalmente por el embrión (esporofito joven) que proviene de la división y diferenciación celular del cigoto; un tejido de reserva, que puede ser el endospermo y/o el perispermo, que provienen del desarrollo de la célula central y un núcleo espermático y de la nucela respectivamente y la cubierta seminal, cuyo origen son los o el tegumento (Bojhwani y Bhatnagar, 1981). Generalmente las cubiertas son impermeables (Bidwell, 1979).

Las semillas de la familia Convolvulaceae poseen, en la madurez, un embrión bien diferenciado, endospermo escaso y una cubierta seminal (testa) producto de la diferenciación del único tegumento (Márquez-Guzmán y Laguna-Hernández, 1982). Son semillas impermeables al agua por poseer testa dura que impide el paso del agua hacia los tejidos internos (Wong, 1991).

Su cubierta seminal está formada por 4 capas celulares: epidermis monoestratificada, subepidermis monoestratificada, esclerénquima empalizada pluriestratificada y parénquima también pluriestratificada, que en la semilla madura queda reducida a paredes celulares comprimidas (Ponce, *et al.*, 1990).

Ponce Salazar, *et al.* (1990) indican que en *Ipomoea purpurea* son 3 los sitios que

pueden estar involucrados en la impermeabilidad de la cubierta seminal al agua: cutícula, subepidermis y esclerénquima.

En la testa, las células del primer estrato del esclerénquima en empalizada adyacente a la subepidermis, presentan una "estructura" conocida como línea clara (light line). Esta "estructura" se ha observado en muchas semillas que poseen una latencia impuesta por testa dura y que son impermeables al agua (Serrato-Valenti, *et al.*, 1979; Bevilacqua, *et al.*, 1985; Harris, 1987).

Si la línea clara está o no involucrada en el fenómeno de la impermeabilidad de la cubierta seminal, es algo que no se ha esclarecido.

La naturaleza de la línea clara tampoco ha sido establecida, y aunque se conoce muy poco sobre su función, muchos investigadores coinciden en señalar que esta región representa la barrera que impide el movimiento libre de agua hacia el interior de algunas semillas de leguminosas (Watson, 1948; McKee, 1977; Rolston, 1978; Bevilacqua, *et al.*, 1985).

Los trabajos que mencionan a la línea clara, lo hacen de manera colateral y en la literatura revisada, sólo se encontraron dos estudios que datan de 1935 y 1979, realizados *expresamente* sobre esta estructura (Hamly, 1935; Serrato-Valenti, *et al.*, 1979).

Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue la detección de la línea clara durante el desarrollo de la testa de *Ipomoea purpurea*, mediante la aplicación de diversas técnicas de tinción y de microscopía fotónica.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTRUCTURA DE LAS SEMILLAS

En el reino Plantae las semillas se encuentran restringidas en dos divisiones: las Gimnospermas y las Angiospermas. Las primeras poseen semillas desnudas y las últimas encerradas por el ovario (Raven, *et al.*, 1986).

Existen aproximadamente 300,000 especies de Angiospermas cuyas semillas poseen características muy variables: tamaño, color, peso, estructuras postfecundación, metabolitos secundarios, materiales de reserva, etc.

Las semillas de las Angiospermas cumplen importantes funciones en el ciclo de vida de estas plantas: conservación, diseminación y presentan estructuras de resistencia a condiciones no favorables (Esau, 1987).

Toda semilla contiene reservas que pueden ser: carbohidratos, proteínas, grasas y minerales para nutrir al esporofito que se encuentra en su interior.

Algunas clases de semillas en la madurez tienen su reserva alimenticia dentro de sus cotiledones (hojas embrionarias). En otras, se encuentra dentro de un tejido que se desarrolló del saco embrionario, llamado endospermo, o de las células nucleares que rodeaban el saco embrionario llamado perispermo.

La fecundación estimula el desarrollo y la diferenciación del óvulo que culmina con la formación de una semilla.

El cigoto, producto de la fusión de una de las células espermáticas con la ovocélula, da origen al embrión, el cual representa el desarrollo del nuevo esporofito; el núcleo primario del endospermo, resultado de la fusión de los núcleos polares; el segundo gameto masculino,

da lugar al endospermo. Los tegumentos forman la cubierta seminal. De este modo, los diferentes detalles estructurales del óvulo se conservan en diferentes grados durante su transformación en la semilla. Cada uno de estos sucesos ocurren en una serie de etapas Interdependientes que siguen una secuencia característica (Bhojwani y Bhatnagar, 1981; Esau, 1987).

La semilla así formada, sigue cuatro fases distintas en su desarrollo:

- * Fase de división celular
- * Fase o etapa de crecimiento
- * Periodo de acumulación de sustancias de reserva
- * Periodo de maduración

El periodo de maduración se caracteriza por una reducción general en el metabolismo, debido a la pérdida de humedad (Bidwell, 1979).

El embrión sólo, o el embrión y el endospermo, ocupan el volumen mayor de la semilla. Los tegumentos sufren una serie de cambios histológicos significativos para transformarse en la cubierta seminal. En óvulos bitégmicos la cubierta seminal puede derivarse de ambos tegumentos por ejemplo en *Gossypium sp.*, *Ricinus sp.* o bien el tegumento interno puede desaparecer durante la ontogenia de la semilla y la cubierta queda formada únicamente por el tegumento externo como en Cucurbitaceae y Fabaceae (Bhojwani y Bhatnagar, 1981).

2.2. GERMINACION

El proceso de germinación consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento.

El agua es uno de los factores principales para que se realice este proceso, ya que la semilla madura mantiene una condición de humedad extremadamente baja (5 - 10%) en relación con su peso seco (Larqué y Trejo, 1990). De este modo, la rehidratación de las semillas constituye una etapa esencial para la germinación. Las semillas de muchas especies (*Phaseolus sp.*) pueden germinar inmediatamente después de que se desprenden de la planta madre, si se tienen las condiciones favorables de humedad, temperatura y aereación.

Muchas otras semillas no germinan aún cuando se encuentran en condiciones ambientales favorables. Este periodo que varía de una especie a otra se conoce como periodo de latencia (Bhojwani y Bhatnagar, 1981).

2.3. LATENCIA

Se entiende por latencia, el estado de crecimiento y metabolismo suspendidos, aunque las condiciones sean ideales. Esto indica que la latencia puede ser impuesta desde dentro y controlada por mecanismos celulares (Bidwell, 1979).

El letargo seminal tiene una importancia crítica para la supervivencia de las plantas, y muchos mecanismos diferentes han evolucionado para alcanzar tal fin; un periodo forzoso de baja actividad metabólica, bajo contenido de agua y nulo crecimiento durante el cual la semilla es muy resistente a los rigores del frío y de la sequía. Además, han evolucionado mecanismos que impiden a algunas semillas germinar inmediatamente después de caer al suelo, aunque las condiciones ambientales sean buenas. Este es un requisito, que implica un periodo de desarrollo posterior entre la caída de la semilla y su germinación.

De acuerdo con Bidwell (1979), los distintos mecanismos que causan la latencia en las semillas o la prolongan impidiendo la germinación son los siguientes:

1.- Factores ambientales:

- a. Exigencia de luz para germinación: positiva o negativa
- b. Altas temperaturas
- c. Ausencia de agua

2.- Factores internos:

- a. Testa de la semilla: impide el intercambio gaseoso
- b. Testa de la semilla: impide el paso de agua
- c. Inmadurez del embrión
- d. Baja concentración del etileno
- e. Presencia de inhibidores
- f. Ausencia de promotores de crecimiento

3.- Mecanismo de cronometraje:

- a. Posmaduración
- b. Desaparición de los inhibidores
- c. Síntesis de promotores del crecimiento

En general, se reconocen dos mecanismos que causan el estado de latencia en las semillas:

- 1) Latencia impuesta por el embrión
- 2) Latencia impuesta por la cubierta seminal o testa

El tipo más común de latencia es aquel, en el que el embrión requiere de un cierto periodo después de la cosecha (posmaduración) para poder germinar. Durante este periodo el embrión puede sufrir una maduración estructural y/o fisiológica.

Los cambios fisiológicos pueden estar asociados con la presencia de inhibidores o bien, con la ausencia de promotores de crecimiento (Bidwell, 1979; Bhojwani y Bhatnagar, 1981).

2.4. SEMILLAS DURAS

En algunas ocasiones las semillas viables no absorben el agua, de tal manera que la germinación no ocurre aún bajo condiciones favorables.

Las semillas que son incapaces de absorber el agua son comúnmente conocidas como semillas duras o impermeables y representan el tipo de latencia generado por la cubierta seminal o testa (Quinlivan, 1971).

A pesar de que se han realizado numerosas investigaciones en torno al tipo de latencia impuesto por la cubierta seminal, existen discrepancias sobre los componentes celulares que le confieren la impermeabilidad a la semilla. Algunos autores han registrado que la cutícula constituye la barrera que impide el movimiento de agua hacia el interior de la semilla (Watson, 1948; Mckee, 1977; Rolston, 1978; Bevilacqua, *et al.*, 1984).

También se ha considerado al esclerénquima en empalizada como una característica común de las semillas duras debido a su estructura y naturaleza química (Lute, 1928 ; Raleigh, 1930; Spurny, 1972).

Datta y Biswas (1970) encontraron que la estructura y arreglo de las células del esclerénquima en empalizada representan una barrera al paso de agua y una total inhibición de la germinación.

Rolston (1978) atribuye la dureza de la semilla a los engrosamientos de la pared celular de algunos tipos celulares. Considera que la base de las células del esclerénquima constituye

la barrera de impermeabilidad debido a la presencia de lignina y sales. Otros autores (Ballard, 1973; Bevilacqua, 1985) la asocian con Incrustaciones de suberina y cutina.

Hasta el momento, se ha atribuido el estado de la latencia de la semilla a una capa en particular de la cubierta seminal. Sin embargo, algunos autores consideran que la dureza de la semilla puede ser el resultado de la interacción de dos o más capas.

Watson (1948) trabajó con 21 especies de la familia Papilionaceae con el propósito de relacionar la estructura y composición química de la cubierta seminal con la germinación de las semillas. Demuestra que las características estructurales y químicas de la testa no siempre se encuentran asociadas con las especies que presentan bajos porcentajes de germinación. Observó que las semillas de *Melilotus alba*, con porcentajes de germinación del 14%, tienen un esclerénquima en empalizada con paredes engrosadas y con depósitos de cutina y suberina. Esta capa presenta una naturaleza muy similar en las semillas de *Melilotus officinalis*, la cual presenta porcentajes de germinación altos y bajos. Las osteosclereidas están constituidas en la mayoría de los casos, de materiales más permeables, de tal manera que no representan un problema en la imbibición de las semillas.

Concluye que la presencia de suberina y cutina en la capa subcuticular y el engrosamiento y la naturaleza química de las células malpighianas encontradas en cada especie justifican las altas tasas de impermeabilidad.

McKee, et al. (1977) trabajaron con semillas de *Coronilla varia*, con el objeto de determinar la región o regiones de la cubierta que se encuentran asociadas con la impermeabilidad. Encontrando que la cutícula, células de Malpighi, osteosclereidas y la capa de aleurona influyen en la imbibición de la semilla.

Bevilacqua, *et al.* (1984) mencionan que a pesar de que la cutícula, la subepidermis y el esclerénquima en empalizada están involucrados en el mantenimiento de la impermeabilidad, el estado de latencia de las semillas de *Cercis siliquastrum* está dado por la completa impermeabilidad del hilo y de una capa no celular, de naturaleza lipóide, situada entre la superficie interna del tegumento y el endospermo.

Entre los factores internos que evitan la germinación de una semilla se encuentra la cubierta seminal que puede funcionar bloqueando el paso del agua y/o el intercambio gaseoso. A este tipo de semillas se les llama semillas de testa dura o simplemente semillas duras (hard seeds).

Muchas clases de semillas permanecen en estado latente por algún tiempo después de separarse de sus progenitores.

El estado latente debido a la resistencia al agua (dureza) de la cubierta de la semilla, puede durar varios años, hasta que suficiente agua haya humedecido la parte interior de la semilla para que germine. Pequeños cortes o raspaduras en la cubierta de la semilla permiten que el agua penetre, rompiendo así el estado latente.

La ruptura natural de las semillas (por la congelación y deshielo del agua del suelo o por los movimientos de las partículas de roca causados por el agua) permite que ésta penetre a la semilla. Bajo condiciones de laboratorio las semillas duras de ciertas plantas cultivadas son raspadas artificialmente para iniciar la germinación.

2. 5. LINEA CLARA

Se ha observado que muchas de las semillas que poseen una latencia impuesta por

testa dura y son impermeables al agua, presentan en su cubierta seminal una "estructura" conocida en la literatura como línea clara.

Vázquez-Yáñez y Pérez-García (1976) mencionan que la semilla de *Ochroma lagopus*, posee cubierta seminal dura e impermeable al agua, y una línea clara que puede estar relacionada con la impermeabilidad.

En las semillas de las leguminosas también se presenta la línea clara (Ballard, 1973, en Rolston, 1978).

En la familia Convolvulaceae hay especies con testa dura y en todas las especies estudiadas, se han observado una o dos líneas claras (Murcio, 1983; Murguía, 1986; López-Curto, 1987; Ponce, *et al.*, 1990).

Ballard, (1973, en: Rolston, 1978) propone que la impermeabilidad de la semilla está dada en estratos más profundos, por debajo de la línea clara.

Son dos los reportes conocidos por nosotros cuyo tema central de estudio es la línea clara. El más antiguo data de 1935. D.H. Hamly estudia la cubierta seminal de *Melilotus alba* concluyendo que la línea clara es en realidad un fenómeno óptico producido por la yuxtaposición de celulosa y suberina en las paredes celulares de las células de Malpighi (Hamly, 1935). El segundo autor (Serrato-Valenti, *et al.* 1979), establece que de acuerdo a sus estudios la línea clara es una modificación estructural de las células de Malpighi y que esto se ve muy claro con microscopía electrónica de barrido, aunque también menciona que es un fenómeno óptico (línea de Becke), que se hace muy evidente al microscopio de polarización.

Aunque se conoce muy poco sobre la naturaleza y función de la línea clara, muchos investigadores coinciden en señalar que esta región representa una barrera que impide el

movimiento libre de agua hacia el interior de algunas semillas de leguminosas (Watson, 1948; McKee, 1977; Rolston, 1978; Bevilacqua, *et al.*, 1985).

2.6. FAMILIA CONVULVACEAE

Las convulváceas son plantas herbáceas, erectas o volubles, arbustivas o a veces arbóreas; frecuentemente provistas de látex. Hojas alternas, simples pero con frecuencia lobadas o partidas, en ocasiones reducidas a escamas (*Cuscuta*). Flores axilares, solitarias o dispuestas en cimas bracteadas. Pedúnculo articulado. Flores hermafroditas, actinomorfas. Cáliz por lo menos de 5 sépalos, a veces unidos en la base, con frecuencia acrescentes en el fruto. Corola simpétala con el limbo entero o (3 a 5 lobado), de prefloración contorna. Estambres 5, insertos en la corola. Disco presente o ausente, ovario súpero, entero o profundamente bilobado (*Dichondra*), típicamente bicarpelar y bilocular (aunque puede variar entre 1 y 6, carpelos y lóculos), óvulos 2 en cada lóculo, por lo general de placentación axial, estilos 1 o 2; estigma único, capitado, con frecuencia 2 o 3 (hasta 5) - lobado, o bien, con 2 estigmas globosos, elipsoides o lineares. El fruto por lo común es una cápsula loculícida con 2 semillas (a menudo pubescentes) en cada lóculo.

La familia Convolvulaceae tiene cerca de 50 géneros, con aproximadamente 2000 sp., tropicales y subtropicales. *Ipomoea* es el género más abundante con 400 especies aproximadamente, del tipo de las enredaderas (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

2.6.1. Género *Ipomoea*

El género *Ipomoea*, perteneciente a la familia Convolvulaceae, está representado por

más de 500 especies de plantas tropicales y subtropicales con algunas que llegan a distribuirse dentro de las latitudes templadas (Edle y Ho, 1969 ; Mac Donald, 1982).

Las especies de este género han llamado la atención de embriólogos vegetales y botánicos debido a su importancia económica y agrícola; ya sea como productos de valor alimenticio, medicinal u ornamental (*I. batatas*, *I. purga*, *I. tricolor*, *I. nil*) o como malezas que afectan cultivos comerciales como el del maíz y frijol (*I. purpurea*) (Edle y Ho, 1969).

Dentro de la amplia gama de especies que infestan los cultivos de maíz y sorgo, se encuentra *I. purpurea*, de hábito trepador, conocida comúnmente como correhuela y meloncillo (*Cucumis melo*), las cuales son responsables de una serie de daños indirectos que se reflejan en un mayor costo en la producción y menor calidad del producto cosechado (Castro, 1976).

2.6.2. *Ipomoea purpurea* (L.) Roth

Planta herbácea anual, de 20 a 100 cm, de longitud, rastrera o trepadora. Tallo generalmente ramificado en su base, hirsuto-pubescente, con pelos amarillos hasta 4.0 mm de largo. Peciolos de 4 a 20 cm de largo, pubescentes. Láminas de la hoja cordiformes ovadas, enteras o trilobadas o bien raramente 5 lobadas, de 3 a 17 cm de largo y 2 a 15 cm de ancho. Apice agudo a acuminado. Base cordada de seno profundo, con pubescencia esparcida a densa en ambas caras, misma que disminuye con la edad. Flores solitarias o en cimas 2/5 flores en las axilas de las hojas. Pedúnculos de 0.2 a 18 cm. de longitud. Pedicelos de 5 a 20 mm de largo, ambos pubescentes a tomentosos. Brácteas lanceoladas, de 1 a 9 mm de largo, pubescentes. Sépalos desiguales, los exteriores lanceolados a angostamente elípticos, de 8 a

17 mm. de longitud y de 2 a 5 mm de ancho, acuminados, hirsuto-pubescentes, principalmente en la base, con pelos largos amarillos de base engrosada, los interiores angostamente lanceolados, de 8 a 17 mm de longitud y de 2 a 3 mm de ancho, acuminados con bordes escariosos y ligeramente pubescentes en la parte media. Corola infundibuliforme, de color púrpura (el tubo a veces blanco) de 2.5 a 5.0 cm de longitud, glabra filamentososa, de 13 a 30 mm. de longitud. Anteras de 1.0 a 3.0 mm de largo ovario cónico, glabro, 3 locular, con 6 óvulos; estilo de 14 a 27 mm de longitud. Estigma 3 globoso. Cápsula subglobosa, glabra de 9.0 a 11.0 mm de diámetro, 6 valvar, 3 locular, con 6 semillas de 4.0 a 5.0 mm de longitud y más o menos 4.0 mm de ancho (Rzedowski & Rzedowski, 1985).

2.7. ESTRUCTURA Y DESARROLLO DE LA SEMILLA EN LA FAMILIA CONVULVACEAE

Jos (1963) recopiló información sobre la anatomía de la cubierta seminal de varios miembros de la familia Convolvulaceae; Sampathkumar y Ayyangar (1982) describieron las características morfoanatómicas de las semillas maduras de 33 especies de la familia.

Entre los trabajos que han contribuido al conocimiento de la embriología de diferentes géneros pertenecientes a la familia Convolvulaceae está el realizado por Tiwari y Chandra (1985).

Existen en la literatura algunos trabajos sobre la estructura de la testa de semillas de las Convolvulaceae (Woodcock, 1942; Sripleng y Smith, 1960; Kaur, 1969; Márquez-Guzmán y Laguna-Hernández, 1982).

La testa de *I. aquatica* está constituida por una epidermis y subepidermis uniestratificadas, un esclerénquima en empalizada formada de 3 a 4 estratos celulares y una

capa de células parenquimáticas cuyo número de estratos disminuye conforme avanza el desarrollo. De acuerdo con Márquez-Guzmán (1986), este patrón estructural se ha observado en todas las semillas estudiadas, por lo que se considera como un carácter diagnóstico de la familia Convolvulaceae.

En las especies de la familia Convolvulaceae el primer estrato de esclereidas es de mayor longitud y presenta una o dos líneas claras.

Sripleng y Smith (1960) señalan que el esclerénquima en empalizada puede estar formado por 2 ó más estratos, sin embargo, esto no afecta la posición de la línea clara.

Jos (1963) reportó que la semilla madura de *I. aquatica* presenta un esclerénquima en empalizada formado por 2 ó 3 estratos. En el trabajo de Valdovinos (1992) se observaron de 3 a 4 estratos celulares de esclerénquima, además de la presencia de una línea clara en el estrato adyacente a la subepidermis. Esta discrepancia puede atribuirse al nivel y al plano de corte y a que los cortes en los cuales se basó la descripción, corresponden a distintas regiones de la semilla; o bien, que las observaciones de Jos (1963) se hicieron en semillas que no habían alcanzado la madurez.

2.7.1. Estructura de la testa de *Ipomoea purpurea*

Algunos autores han estudiado la estructura de la testa de *I. purpurea*, pero los resultados de las observaciones difieren entre sí (Govil, 1970; Kaur y Sing, 1970; Marbach y Mayer, 1975).

Jos (1963), Ponce-Salazar, *et al.* (1990) estudiaron el desarrollo de la semilla en *I. purpurea* con énfasis en la estructura de la testa. Establecen que la cubierta seminal madura

está formada por 4 capas celulares: epidermis uniestratificada, subepidermis uniestratificada, esclerénquima en empalizada con tres estratos y restos de parénquima. Señalan la presencia de una línea clara en el primer estrato de esclereidas adyacentes a la subepidermis (Fig. 1).

A partir de los 30 días posantesis se empieza a observar una línea clara en el estrato más externo del esclerénquima en empalizada.

Las células parenquimáticas continúan consumiéndose.

La testa en la semilla madura queda formada por 4 capas celulares diferentes:

- 1) Epidermis uniestratificada transformada en tricomas.
- 2) Subepidermis uniestratificada.
- 3) Capa de esclerénquima en empalizada formada por 3 a 4 estratos de células alargadas en dirección perpendicular a la superficie de la semilla y de gruesas paredes.
- 4) Parénquima que ha quedado reducido a una capa de paredes celulares comprimidas.

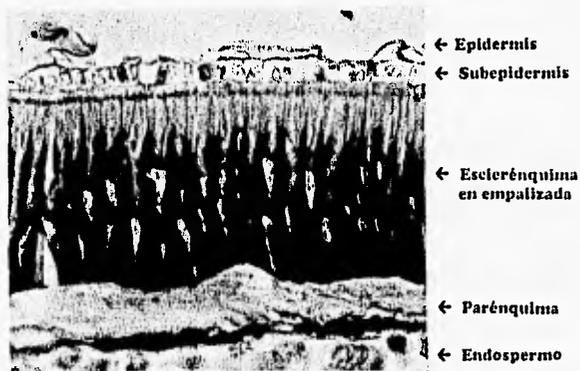


Fig. 1. Fotografía de un corte histológico transversal de testa de *Ipomoea purpurea*.

Resumiendo los conocimientos obtenidos acerca de la línea clara por la revisión de la literatura sobre el tema, se puede concluir que:

- 1) La línea clara se ha observado en ciertas cubiertas de semillas que pertenecen a distintos taxa.
- 2) La presencia de la línea clara se ha detectado en semillas con cubiertas impermeables al agua.
- 3) La estructura y naturaleza química de la línea clara no se ha establecido. Algunos resultados sobre el tema son aislados y no concluyentes.
- 4) Sólo existen dos trabajos que específicamente estudian la línea clara.
- 5) La mención de esta estructura se ha hecho colateralmente en investigaciones cuyo propósito de estudio es otro.
- 6) La testa de *Ipomoea purpurea* presenta una línea clara y es impermeable al agua.

3. SISTEMAS OPTICOS Y DE ILUMINACION

3.0.1. LINEA DE BECKE

Al utilizar algunas técnicas de microscopía se ha observado un fenómeno conocido como línea de Becke. Esta línea se presenta como una concentración de luz producida por reflexión o la refracción, o ambas. En los límites de una estructura, esto se da siempre que una muestra se encuentra sumergida en un medio con diferente índice de refracción, y al verse al microscopio, enfocando ligeramente por encima de su posición de enfoque correcto, se presentan por lo general 2 líneas (una oscura y otra brillante), que son concéntricas en el borde. La más brillante de ambas líneas, está más cerca del material o estructura que tiene el índice de refracción mayor y por tanto siempre se desplaza hacia el medio que tiene mayor índice de refracción cuando se mueve el microscopio por encima de la posición de enfoque.

Las líneas de Becke se hacen más patentes si se cierra el diafragma iris del condensador (Donald, 1970). A estas líneas se les ha dado el nombre de Becke en honor al Minerólogo y Petrógrafo Friedrich Johann Karl Becke (Praga, Checoslovaquia 1855 - Viena, Austria 1931), quien desarrolló métodos para la determinación relativa de la refracción de la luz por medio de la línea que lleva su nombre.

3.1. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

El microscopio es un instrumento óptico y mecánico que modula energía y amplifica el ángulo de visión humana para producir imágenes amplificadas de un objeto cualquiera. Gracias a Ernest Abbe (padre de la Microscopía, 1840-1905), el microscopio llegó a convertirse en un magnífico instrumento de investigación que hoy conocemos. Su "teoría de la formación de la imagen en el microscopio" establece la base de muchos descubrimientos realizados desde entonces o en la aplicación consecuente de la misma. Un ejemplo claro de esto es el procedimiento de contraste de fases propuesto por Fritz Zernike en los años de 1932 a 1934. Su teoría establece que un microscopio no es usado para ver objetos luminosos, sino que se emplea para ver objetos que tienen que ser iluminados a través de un condensador. Se ha visto que cuando la luz viene de un objeto así iluminado, especialmente cuando éste tiene muchos y pequeños elementos estructurales, el objeto se comporta como una rejilla de difracción, donde en cada una de ellas se producen frentes de ondas secundarios. De acuerdo a Begunov, (1976), los rayos difractados llevan la información de las características estructurales del objeto y entre más rayos difractados pueda recoger el objetivo, la imagen formada representará más fidedignamente al objeto.

En una larga serie de publicaciones comenzadas en 1869, Abbe dió a conocer sus trabajos sobre la importancia de los diafragmas, el aplanatismo, el acromatismo y la luminosidad. En 1873, se publicó su trascendental trabajo sobre la teoría de los microscopios. De 1882 a 1883 se ocupó nuevamente de las relaciones entre la abertura numérica y el aumento. A él corresponde el mérito de haber reconocido que el parámetro más importante del microscopio no reside en su potencia de aumento, sino en su poder de resolución. Abbe, en 1887, popularizó el más simple de los condensadores conocido a partir de entonces como "condensador de Abbe"; el cuál consiste de dos lentes plano-convexas de gran diámetro, separadas considerablemente por aire y con un diafragma iris colocado detrás del plano focal.

A manera de resumen, E. Abbe establece tres postulados de la formación de la imagen al microscopio:

- La imagen que se observa al microscopio, es la imagen del filamento de la lámpara modificado por el objeto.
- El objeto microscópico actúa como una rejilla de difracción.
- Al pasar la luz por el espécimen, se presenta la formación de dos tipos de rayos: los rayos directos y los rayos difractados, los primeros llevan en promedio un 75% de intensidad luminosa y un 25% de información; mientras que los segundos proporcionan un 75% de información del objeto y un 25% de intensidad luminosa (Arredondo y Martínez, 1978).

3.1.1. Principios Físicos

La Microscopía de Campo Claro debe su nombre al tipo de imagen que proporciona, en la cual, el objeto resalta sobre un fondo blanco brillante. Sus fundamentos físicos fueron

calculados prácticamente hasta su último detalle por Abbe, en 1876, cuando desarrolló la teoría de la visión microscópica, en la cual, estableció claramente el cambio de los rayos luminosos en cada parte del microscopio.

Además de Abbe, en 1893, Köhler, establece los parámetros que rigen la correcta iluminación en el microscopio. Este método de iluminación desplaza al método de iluminación Crítica o de Nelson, que era el método más empleado (Martín, 1971).

Para poder aplicar el principio de Köhler conforme a las reglas, se necesita una lámpara con colector y diafragma tipo Iris situado delante de él, lo mismo que un condensador deslizable verticalmente con otro diafragma del mismo tipo. En la mayoría de los casos, los objetivos que se emplean en este sistema son del tipo acromáticos; pero suelen emplearse los de otro tipo. Los oculares más utilizados son los del tipo Huygens. La fuente luminosa es generalmente una lámpara de bajo voltaje (Martín, 1971).

Al graduar el diafragma de la lámpara o de campo, solamente se ilumina en la preparación, lo que es proyectado por el objetivo, como consecuencia de la demarcación dada por el diafragma. Por tanto, no se produce una innecesaria irradiación de energía al espécimen, ni de luz dispersa, susceptible de disminuir el contraste y que procede de las zonas de la preparación cuya imagen no es producida por el objetivo.

La regulación del diafragma de apertura o del condensador, establece un control del contraste de la imagen así como de la profundidad de campo (Arredondo y Martínez, 1978).

3.1.2. Formación de imagen

El microscopio compuesto consiste de dos sistemas de lentes, una llamada objetivo y la

otra llamada ocular. La lente objetivo tiene una distancia focal corta, por lo que el objeto a examinar se coloca a una distancia muy cercana a la lente; la cual forma una imagen real e invertida y aumentada en un punto intermedio entre el objetivo y el ocular.

Puesto que la lente ocular, es también de distancia focal corta, se utiliza como microscopio simple o lupa, para producir una imagen virtual y ampliada. Así, el ocular recoge la imagen (1) que forma el objetivo del objeto. Esta imagen se encuentra entre la distancia focal y la lente ocular, por lo que se forma una imagen virtual y derecha (2), la cual podrá ser captada por el ojo humano a través del ocular (Fig. 2).

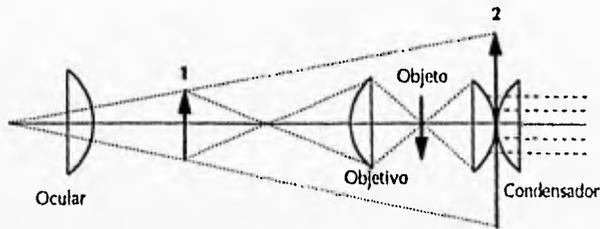


Fig. 2. Formación de una Imagen en un microscopio.

El objetivo controla la ampliación principal y la calidad de la imagen y posteriormente, ésta es recogida y nuevamente aumentada por el ocular. De modo que, entre mejor calidad óptica tenga el objetivo, mejor calidad tendrá la imagen final (Wilson, 1976).

La teoría de Abbe de la formación de imagen microscópica menciona que en general, un microscopio no es usado para ver objetos luminosos, sino que se emplea para ver objetos que tienen que ser iluminados a través de un condensador. Se ha visto que cuando la luz viene de un objeto así iluminado, especialmente cuando éste tiene muchos y pequeños elementos estructurales, el objeto se comporta como un difractor de luz (Tolansky, 1968).

De acuerdo con Tolansky (*op. cit.*), Abbe, en 1873 trata la formación de una imagen dada por un objeto de estructuras periódicas y regulares tal como una rejilla de difracción, donde en cada una de ellas se producen frentes de ondas secundarios (Fig. 3).

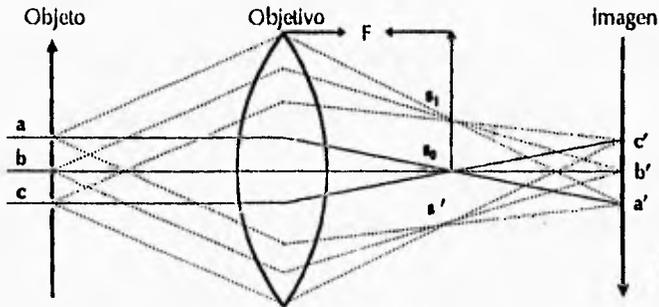


Fig. 3. Difracción y formación de la imagen microscópica. Las líneas punteadas señalan los rayos difractados y las líneas continuas a los rayos directos.

Abbe, hizo el curioso descubrimiento que al suprimir los rayos difractados provenientes de las rendijas del objeto, ésto es, dejando pasar solamente los rayos directos, o los de orden 0, en el plano focal posterior del objetivo, los únicos cursos de luz que se presentan son los que se interfieren en S_0 , perdiéndose mucha información concierne a la estructura del objeto. Esto dá como resultado que en la imagen la imagen del objeto aparezca como una superficie uniformemente iluminada y solamente cuando los rayos difractados sean recogidos por la lente y éstos se interfieran constructivamente en S_1 y S_1' (los cuales corresponden a los rayos difractados del primer orden de las rendijas a,b,c), y entonces se lleva a cabo la formación de imagen con todo detalle.

3.1.3. Observaciones Generales

El microscopio de campo claro ha sido usado desde su invención, para observar todo tipo de muestras: vivas, muertas, coloreadas, etc.; sin embargo, en la actualidad, su uso más recomendado es en la observación de material procesado con colorantes que incrementan el contraste entre las partes de la muestra y el medio que les rodea.

3.2. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

La microscopía de contraste de fases es una técnica que permite la visibilidad de detalles y buen contraste en aquellos objetos tan transparentes, que con la luz ordinaria son prácticamente invisibles, en los que las variaciones locales del índice de refracción son muy pequeñas. Se aplica principalmente en estudios biológicos, en los que se elimina la necesidad de fijar y teñir el espécimen, permitiendo por lo tanto el examen de células vivas, empleando técnicas de fotografía fija o cinematográfica (Arnold, 1974).

La microscopía de contraste de fases fue desarrollada por el profesor holandés F. Zernike. Los trabajos originales fueron publicados en 1942 y, desde entonces, la expansión y éxito de esta técnica ha sido continua en muchos campos de la microscopía y la investigación.

3.2.1. Principio Físico

Para entender la microscopía de contraste de fases es necesario conocer y comprender con toda claridad algunos principios de óptica elemental, como es la formación de ondas, interferencia y retraso.

Formación de ondas: la luz es una forma de energía que se propaga en línea recta en forma de ondas (Fig. 4).

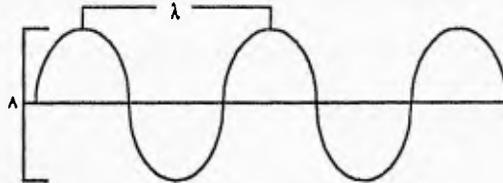


Fig. 4. Esquema de una onda.

La distancia entre los máximos o entre los mínimos es la medida de la longitud de onda que determina el color. La altura por encima o por debajo del eje da la medida de la amplitud, que viene a ser la intensidad.

interferencia: cuando 2 series de ondas o rayos se encuentran en un punto pueden producir distintos resultados, según que las ondas lleguen en fase, es decir, máximo con máximo, o desfasadas, es decir máximos con mínimos, o de un modo intermedio (Fig. 5).

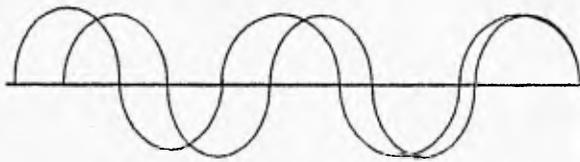


Fig. 5. Interferencia de ondas.

Cuando 2 series de onda llegan en fase, la amplitud de una se suma a la de la otra, lo que da como resultado una mayor intensidad. Cuando las ondas llegan defasadas, el máximo de una es anulado por el mínimo de la otra, lo cual disminuye o anula la amplitud o intensidad. Cuando esto ocurre, se dice que las ondas tienen un desfase de 180° o de la mitad de la longitud de onda, puesto que un ciclo completo de ondas vale 360° .

Cuando las 2 series de ondas se reúnen en condiciones intermedias a las anteriores, es decir, con un desfase menor de 180° , se produce una disminución de la intensidad. Este fenómeno se conoce con el nombre de interferencia (Casartelli, 1968).

Retraso: si 2 rayos de luz paralelos y totalmente en fase, es decir, con los máximos y mínimos que se corresponden perfectamente, los hacemos ir uno a través del aire y el otro a través de una sustancia transparente como el cristal, el rayo que pasa por el cristal se retrasa con respecto al otro. La magnitud del retraso depende de la densidad óptica y de la calidad del cristal (Fig. 6).

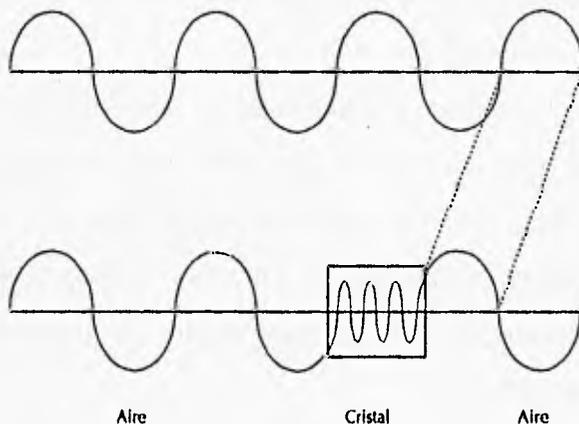


Fig. 6. Retraso de una onda con respecto a otra.

Como puede verse los máximos del segundo rayo, al salir del cristal están retrasados con respecto a los rayos que atraviesan el aire y este retraso ha causado el desfase de los 2 rayos. La luz se retrasa tanto con el aumento de densidad, como de grosor.

Una vez establecidos estos conceptos, estamos ya en condiciones de comprender cómo se logra el contraste de fases. Para esto nos basaremos en el esquema de la Fig. 7 empezando la explicación de abajo hacia arriba.

La luz que proviene de la lámpara del microscopio llega al diafragma anular (d) y esta luz abandona el diafragma anular del condensador en forma de un cono hueco de luz. Los rayos luminosos que ascienden por el condensador, llegan a la muestra (m) iluminándola, entonces los rayos luminosos que han pasado por la muestra, forman 2 cursos de luz: uno directo y otro difractado (éste se desfasa $\frac{1}{4}$ de longitud de onda en promedio) estos se encuentran separados y atraviesan el lente objetivo alcanzando el plano focal posterior del objetivo. Es en este punto donde se localiza una placa de fase o placa de Zernike. Esta placa está fabricada de fluorita de magnesio, en forma de disco y en una de sus caras aparece un anillo que actúa como un filtro de densidad.

Los rayos directos pasan por el anillo (A), los cuales son disminuidos en su intensidad luminosa mientras que los rayos difractados pasan a través del resto de la placa (B) (Fig. 8). Su principio de operación consiste en imponer artificialmente un retraso de $\frac{1}{4}$ de longitud de onda en los rayos difractados con respecto de los rayos directos y además absorben la intensidad luminosa de los rayos directos hasta igualarla con la amplitud de los rayos difractados (Ross, 1967).

Al continuar la marcha de los rayos directos y difractados en el curso del microscopio,

estos alcanzan al plano focal del ocular y es ahí donde se interfieren, proporcionando una imagen rica en detalle y contraste, que va de brillante a oscuro según la interferencia aditiva y/o sustractiva que se suceden entre ambos cursos luminosos (Arredondo y Martínez, 1978).

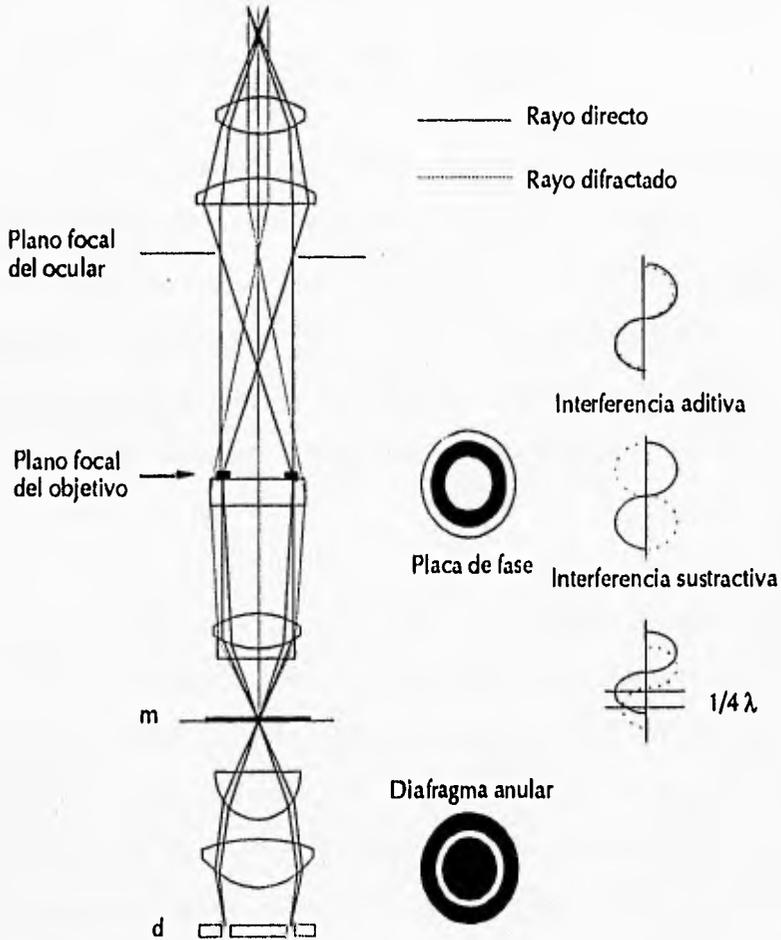


Fig. 7. Esquema de la marcha de los rayos luminosos en un microscopio de Contraste de fases.

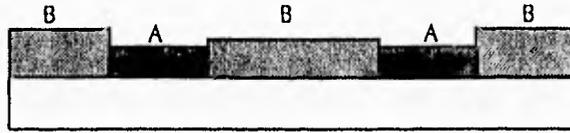


Fig. 8. Placa de fase o de Zernike (ampliada). Capa dieléctrica de retardo (B), capa metálica de absorción (A).

El mayor contraste entre la muestra y lo que lo rodea se obtiene cuando los rayos directos y los difractados se reúnen con un desfase de la mitad o múltiplos de la longitud de onda. Entonces si suponemos que las amplitudes de onda son iguales, no habrá luz debido a que el desfase es de 180° . Pero como el objeto o muestra comprende zonas de distinto grosor o índice de refracción, o ambas cosas. Las amplitudes de onda y los retrasos varían, por lo que el resultado es un complejo de tonos, que van desde el blanco hasta el negro y forman la imagen del objeto.

3.2.2. Observaciones Generales

Durante mucho tiempo, cuando se trataba de preparaciones de cortes biológicos, finos y sin teñir al observarlos al microscopio en campo claro, las imágenes aparecían casi invisibles y carentes de detalles. Las células y núcleos, por citar algún ejemplo, poseen prácticamente la misma transparencia en la gama espectral visible; de forma que es casi imposible apreciar las diferencias de claridad o de color y no quedaba más que diferenciar al objeto por coloración. Sin embargo, el fijado, acondicionado, y teñido suponen operaciones que aunque se realizan con las máximas precauciones, modifican la estructura morfológica.

El contraste de fases ahorra esta clase de operaciones, ya que la estructura física del objeto se transforma en una imagen de amplitud, producido por un desfase de la mitad de la longitud de onda entre los rayos directos y los rayos difractados (Determan, 1974).

3.3. MICROSCOPIA CON LUZ POLARIZADA

La historia y evolución del microscopio de polarización se comprende mejor, si se analiza en dos fases. Por un lado, en cuanto a la evolución y diseño de los agentes polarizantes. Y por otro, en cuanto a la aplicación de la luz polarizada al microscopio para la observación de ciertos objetos.

Hacia 1669, Bartholinus, descubrió la doble refracción de la luz al pasar por un cristal de calcita. Años más tarde, en 1690, Huygens, al estar trabajando con cristales de doble refracción, descubrió la polarización de la luz. Hacia 1810, Malus, encontró que al reflejarse la luz en algunas superficies, presentaba una peculiaridad a la que llamó "luz polarizada". Biot, en 1815, encontró que al hacer pasar luz por un cristal de turmalina, una porción de ella era absorbida, y la porción que se transmitía era plano-polarizada. En 1828, Nicol, diseñó varios prismas de calcita para producir luz polarizada (Stoves, 1957).

En 1880, Gland, mejoró los prismas de calcita al unirlos con Bálsamo de Canadá y de este modo pudo obtener mejores resultados para producir luz polarizada. (Stoves, *op. cit.*)

Hacia 1935, Land elaboró las hojas polarizadoras con cristales de iodo-sulfato de quinina al arreglar paralelamente estos cristales. En 1936, Bernauer, fabricó placas plano-paralelas de Herapatita.

En cuanto a la aplicación de la luz polarizada a las observaciones microscópicas se tiene que; En 1816, Brewster, la aplicó al microscopio simple. Y en 1834, Talbot, la aplicó al microscopio compuesto por primera vez, al utilizar cristales de turmalina y después prismas Nicol. El botánico Wyssling y el zoólogo Schmidt, en 1938, estudiaron las células animales y vegetales. En 1952, Inoué, desarrolló un microscopio de polarización para estudiar estructuras de muy baja refringencia, aplicándolo, al estudio de la mitosis. En 1956, Thornburg y De Robertis, lo aplican para estudiar las fibras nerviosas. (De Robertis, *et al*, 1971).

3.3.1. Principios Físicos

Shurcliff (1968) define a la luz polarizada diciendo: "Es aquella cuya vibración transversal a la dirección de propagación tiene un modelo simple". La luz no polarizada la define en términos negativos diciendo: "Es aquella que no tiene un plano de vibración seccional, esto es, presenta muchos planos de vibración". Así mismo distingue varios planos de vibración (Fig. 9).

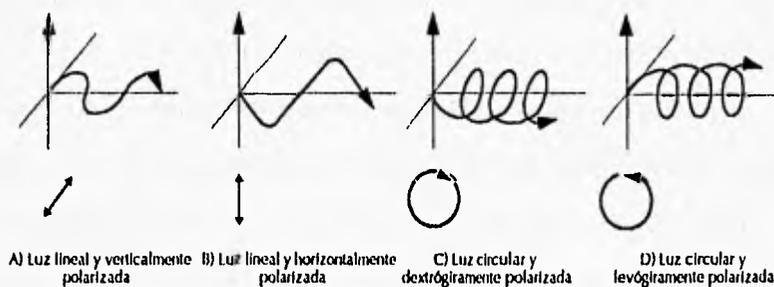


Fig. 9. Planos y secciones de vibraciones de la luz polarizada.

La óptica de polarización permite a los microscopistas investigar las características submicroscópicas y la orientación de moléculas y otros componentes de células y tejidos (Patzelt, 1974). Los métodos de polarización pueden ser usados cualitativamente, justamente para detectar la presencia de dichas estructuras orientadas en un objeto biológico; pero información mucho más valiosa puede obtenerse por la aplicación de la microscopía de polarización cuantitativa (Stoves, 1957; Bennet, 1961).

El microscopio de polarización se distingue del de campo claro porque lleva intercalados en la marcha de los rayos dos agentes polarizantes. Uno de ellos se llama "polarizador", que va colocado inmediatamente después de la fuente luminosa, por debajo del condensador. El otro, va colocado después del objetivo y antes del ocular, a éste se le llama "analyzer". Estos elementos polarizadores consisten de filtros dicróicos (Benett, 1961).

La luz se define generalmente como una forma de energía que se trasmite en línea recta, pero formando ondas en ángulo recto con la dirección de transmisión (Fig.10).

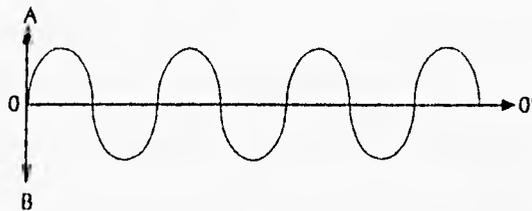


Fig. 10. Los números O, O' representan al eje a lo largo del cual discurre la luz, y AB la altura de las ondas por encima y por debajo del eje.

Sin embargo, la luz vibra no sólo en un plano, sino en todos los planos simultáneamente. Por consiguiente, hay planos de ondas en todos los ángulos (Fig. 11).

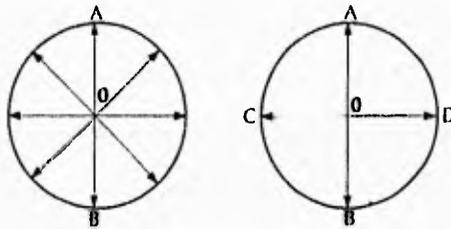


Fig. 11. Si pudleramos mirar a lo largo del eje O , veriamos las ondas en plano vertical.

Este tipo de luz es la luz normal o luz no polarizada, y es la más corriente, como la producida por las lámparas.

Consideremos ahora 2 planos AB y CD perpendicularmente entre sí, y que van a lo largo del eje hasta que se encuentran con un obstáculo, que produce un cambio importante. Si imaginamos cierto tipo de reja o filtro PL, con barras y ranuras paralelas, que se interpone en el eje de transmisión de la luz y dispuesto de tal modo, que las ranuras estén verticales, entonces las ondas verticales pasarán a través; pero las ondas horizontales no podrán pasar por las ranuras verticales y quedarán retenidas en ellas. Un filtro de este tipo se denomina polarizador y la luz que sale de él recibe el nombre de "luz polarizada" (Arnold, 1974). Puede definirse, por tanto, como luz que vibra en un sólo plano, diferenciándose así de la normal que lo hace en todos los planos (Fig. 12).

Colocando otro filtro polarizador sobre el eje de la luz polarizada, entonces las ranuras se colocan verticalmente en el mismo plano que la luz polarizada, por lo que la luz pasará a través de él sin dificultad y continuará hacia O . Este segundo filtro se llama "analizador". Sin embargo, si se pone el analizador de tal modo que sus ranuras, o por usar el término correcto, su eje forma un ángulo recto con el plano de luz polarizada, entonces, como no existen

vibraciones horizontales, toda la luz que vibra en sentido vertical quedará retenida y no pasará luz alguna, es decir, que habrá un fenómeno de extinción (Arnold, 1974).

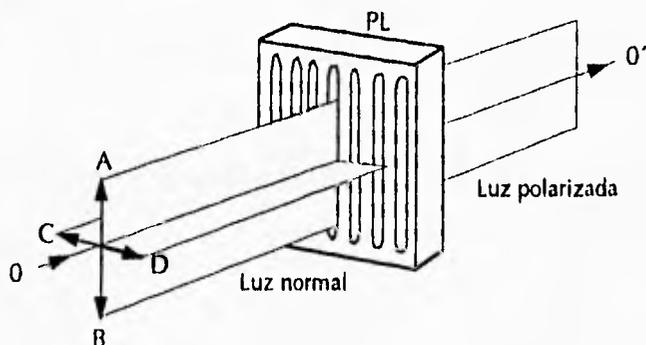


Fig. 12. Luz plano polarizada.

También puede ocurrir que el analizador esté en posición intermedia entre las 2 anteriores. En este caso, existirán ángulos, para los cuales cierta fracción de luz polarizada conseguirá pasar a través. Esta luz, después de atravesar el analizador, seguirá siendo luz polarizada; pero pasará mucho menos luz de la que llega al analizador y la cantidad de luz que pasa será tanto mayor cuanto más próxima a la posición paralela respecto al polarizador sea la posición del analizador.

Mientras que la mayoría de las sustancias transparentes transmiten la luz polarizada sin ninguna alteración del plano de vibración (o plano de polarización), hay ciertas sustancias que hacen girar este plano de vibración de la luz polarizada que pasa a través de él. Estas sustancias se llaman "birrefringentes" u "ópticamente activas" (Patzel, 1974).

La luz normal llega al polarizador PL con su eje vertical. Del polarizador sale luz

polarizada vertical y será retenida totalmente por el analizador si el eje de éste estuviera formando ángulo recto con el polarizador. Pero si se coloca entre ambos una sustancia ópticamente activa, la luz polarizada vertical será girada de plano al pasar por ella y parte de esta luz polarizada pasará a través del analizador y, la luz que sale, aunque su intensidad esté disminuída, será bien visible (Fig. 13).

Debido a sus variadas estructuras moleculares, los diferentes materiales difieren en su apariencia cuando son observados entre polarizadores cruzados.

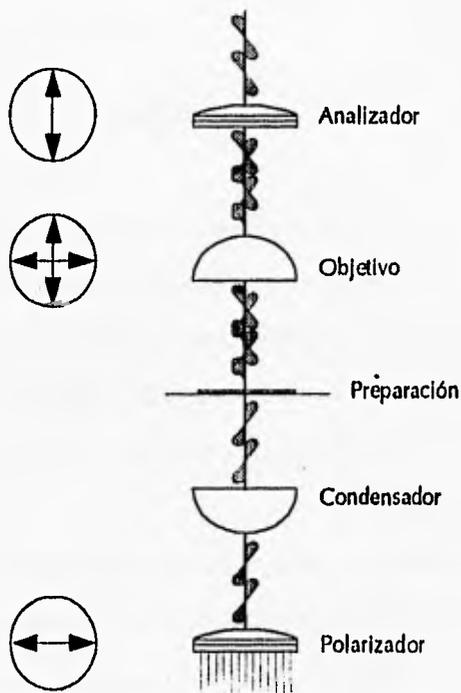


Fig. 13. Curso de los rayos luminosos en el microscopio de polarización

Los materiales isotrópicos no muestran diferencias entre la luz polarizada o la transmitida normalmente, por poseer un índice de refracción único que es independiente del plano de vibración del iluminante. Entre tales materiales se halla el vidrio, los cristales cúbicos y algunos tipos de plásticos (Clarck, 1961).

Los materiales anisotrópicos tienen índices de refracción variables en direcciones diferentes (birrefringencia). Cuando un material anisotrópico se examina entre polarizadores cruzados, el plano incidente de luz polarizada queda cortado en dos componentes que vibran en ángulos rectos entre sí, cada uno de cuyos componentes atraviesa el espécimen a diferente velocidad (es decir con índice de refracción diferente). A la salida del espécimen, estos dos componentes son recombinados por el analizador, pero debido a su diferente velocidad sus relaciones de fase se han alterado, o sea que uno de ellos resulta retrasado respecto al otro, produciéndose entonces la interferencia (Arnold, 1974)

Placa birrefringente o denominada compensador de onda completa (o placa sensible al color), que se inserta con un ángulo de 45° en el plano de polarización. Con ello se ayuda a un retardo artificial de la longitud procedente de la muestra, sumando un retardo total equivalente a una región aproximada al primer orden, donde incluso diferencias pequeñas crean señalados cambios de color (Arnold, 1974). El compensador de onda completa es el más empleado con fines fotográficos.

3.3.2. Observaciones Generales

Una de las aplicaciones de la luz polarizada es la determinación de la presencia o ausencia de sustancias ópticamente activas (Casartelli, 1968).

Entre las sustancias ópticamente activas pueden citarse las siguientes: cristales de toda clase, almidón, cutículas de hojas y bulbos; fibras naturales de algodón, lana, seda, lino, cáñamo y la mayor parte de pelos animales, algunas fibras sintéticas, escamas de pescado, secciones finas de cuernos, pezuñas, garras y uñas; huesos descalcificados, fibras musculares, algunos aceites y grasas. Cruces de malta: el almidón que sólo puede ser detectado como una sustancia ópticamente activa por aparecer iluminado con el polarizador y el analizador cruzados, sino que incluso puede ser identificado porque cada partícula forma una cruz de Malta perfectamente visible.

3.4. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DIFERENCIAL DE INTERFERENCIAS SEGUN NOMARSKI (CDI)

Según Hale (1958), el microscopio de contraste diferencial de interferencias se puede considerar como una derivación de los sistemas interferométricos, diseñados por los de Jamin y Lebedeff, en vista de que, con todos esos sistemas, se obtienen las interferencias entre dos cursos de luz que previamente fueron polarizados por una placa birrefringente.

De acuerdo con Ross (1967), no se puede considerar aisladamente a Nomarski como el creador de este sistema, que más tarde se le llamó "Contraste Diferencial de Interferencias" (CDI); ya que Smith, durante el curso de 1950 y 1955, Philpot, en 1950, y Huxley en 1952 y 1954, diseñaron sistemas de interferencias similares a éste.

Indudablemente, uno de los avances más importantes que condujeron hacia este sistema fue la aplicación de los prismas de Wollaston, como placas birrefringentes para separar y reunir los haces luminosos; dicha aplicación fue llevada a cabo por Huxley,

tempranamente en 1952. Su diseño por de pronto, encontró serias limitaciones debido a la colocación de los prismas en la marcha de los rayos, dando por resultado un instrumento de campo visual y apertura numérica muy reducidas. Posteriormente en 1954, logró un sistema de mayor apertura numérica al aplicar un corrector a base de cristales de calcita para corregir la distorsión provocada por uno de los prismas de Wollaston (Hale, 1958).

Así, Nomarski, en 1952, construyó un sistema similar al de Huxley. En este instrumento, dado a conocer hasta 1955, Nomarski cortó el prisma superior de Wollaston, de tal manera que uno de sus ejes está girado 45° , con lo cual se facilitó que los planos de reunión de los rayos coincidieran dentro del segundo prisma; mientras que Huxley aplicó correctores sin obtener buenos resultados. Así el sistema diseñado por Nomarski, fue un instrumento con campo visual y poder de resolución más amplios, en donde la imagen final es el resultado de la interferencia llevada a cabo entre los rayos luminosos (Hale, 1958; Patzelt, 1974).

La casa Carl Zeiss, en 1965, bajo la dirección de Nomarski, elaboró estos instrumentos a escala comercial y a partir de entonces se dieron a conocer al mundo científico (Ross, 1967; Wunderer y Witte, 1970).

La primera aplicación del Contraste Diferencial de Interferencias, la llevaron al cabo Allen, David y Hirsch durante 1966, quienes obtuvieron un cortometraje de la estructura y actividad ciliar del aparato bucal de un rotífero. Trabajo que llevaron a la Royal Microscopical Society durante el centenario de su fundación (Ross, 1967). Bayer y Allen, en 1966, pusieron aún en mayor evidencia las potencialidades de este sistema al estudiar objetos de contraste homogéneo, al aplicarlo para analizar el huso mitótico en vivo de células de endospermo de

Haemanthus katherinae, el cual no era visible bajo ningún otro sistema óptico; debido a la escasa diferencia en el índice de refracción entre el huso mitótico y el citoplasma, que se presenta en esta planta durante la gametogénesis (Bayer y Allen, 1966; Ross, 1967).

El primer dispositivo de Contraste Diferencial de Interferencias se basa igualmente en el principio de polarización y la birrefringencia, con lo cual, los objetos, sin haber sido teñidos, se exhiben con una gran riqueza de contraste (Determann, 1971). Sin embargo, a diferencia del dispositivo de interferencias con polarización de Jamin Lebedeff, el desdoblamiento de la imagen y la separación entre el rayo ordinario y el rayo extraordinario es menor que el poder de resolución de la óptica empleada (Ross, 1967). Por lo tanto, los conceptos de rayo del objeto y rayo de referencia pierden completamente su significado, por el hecho de que ambos rayos son influenciados por el objeto. De esta manera es que en el microscopio no se registra ninguna doble imagen visible (Determann, 1971; Patzelt, 1974). Dicha separación, se obtiene en la aplicación de los prismas de Wollaston como placas birrefringentes, cuya función es dividir y unificar los haces (Lang, 1970a).

3.4.1. Principios Físicos

A fin de una mejor comprensión, se hace imprescindible plantear el funcionamiento del prisma de Wollaston. El prisma consta de dos cuñas de material birrefringente, unidos entre sí por un material cementante, donde los planos de los ejes ópticos se encuentran formando un ángulo de 90° entre sí (Lang, 1970b; Smith, 1971).

Cuando se hace incidir un haz de luz planopolarizado sobre la superficie de este prisma, cuando forma un ángulo de 45° a la sección principal del prisma (fig. 14), sobreviene

la separación de las ondas parciales, cuyos planos de oscilación son ortogonales entre sí. Dicha separación se produce en el canto de unión de ambas cuñas y la dirección de propagación de ellas forman un ángulo relativamente agudo, al que se le ha hecho llamar "Separación Diferencial de los Haces" (Lang, 1970a; Patzelt, 1971).

En vista de que la velocidad de propagación de una onda luminosa en el cristal es proporcional al índice de refracción, de ahí resulta que, la velocidad del rayo ordinario es mayor que la del rayo extraordinario en la primer cuña del prisma. Por lo tanto el rayo ordinario se adelanta al rayo extraordinario; pero al alcanzar la segunda cuña, como el eje óptico de este cristal está girado 90° , entonces el rayo ordinario se comporta como rayo extraordinario y viceversa. Esto es, el rayo ordinario se atrasa con respecto al rayo extraordinario. En consecuencia, las ondas luminosas, al salir del prisma, han recorrido caminos ópticos iguales, y por lo tanto, la diferencia de marcha entre ambos es igual a cero (Patzelt, 1974; Lang, 1970b).

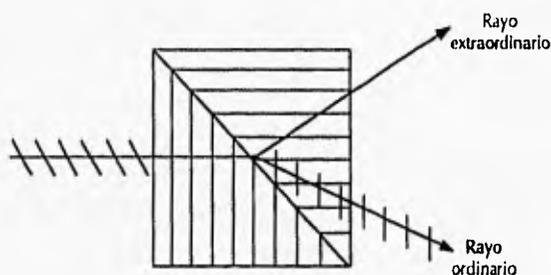


Fig. 14. Separación angular de los haces luminosos.

Si por motivos especiales se desea una diferencia de marcha entre ambos rayos, ésta podrá conseguirse desplazando lateralmente el prisma de Wollaston con respecto a los haces

incidentes, lo cual permite obtener diferencias en el recorrido óptico entre los rayos, y por lo tanto, seleccionar ya sea adelantos del rayo ordinario con respecto al rayo extraordinario o viceversa (Smith, 1971; Lang, 1970c).

En este instrumento la luz procedente de la fuente luminosa es linealmente polarizada por un polarizador, de modo que la luz emergente de él tiene un plano de oscilación inclinado a 45° con respecto al plano del dibujo (Fig.15).

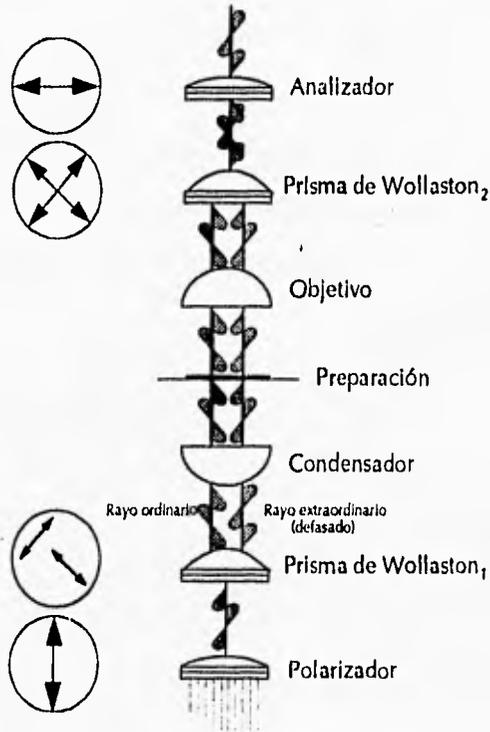


Fig. 15. Curso de los rayos luminosos en el microscopio de Contraste Diferencial de Interferencias.

Para alcanzar el prisma de Wollaston₁, donde se provoca la separación angular de los rayos; así uno de los rayos marcha perpendicularmente al plano del dibujo y el otro paralelo. Después de salir dichos rayos del condensador, ambos rayos viajan separados lateralmente en un valor muy pequeño. Entonces, atraviesan la preparación y el objetivo del microscopio, para converger en plano focal posterior del objetivo, donde está colocado el segundo prisma de Wollaston₂, que de acuerdo a sus dimensiones y propiedades cristalópticas es idéntico al primer prisma, y cuya función junto con el objetivo es unificar los rayos. Aunque después de salir los haces del prisma Wollaston₂ y ambas ondas parciales hayan sido reunidas en una sola, no por ello dejan de seguir polarizadas linealmente, siendo sus planos de vibración perpendiculares entre sí. Con el objeto de que ambas ondas puedan interferirse en el plano de la imagen intermedia, es necesario que coincidan sus planos de vibración. Ello se logra intercalando un analizador en la trayectoria de los rayos.

Para este propósito el analizador está orientado a 45° de los planos de vibración de los rayos incidentes. Ahora ambas ondas parciales poseen la misma intensidad y son resueltas en una sola, linealmente polarizada. La imagen intermedia interferóptica así obtenida, es como de costumbre aumentada por el ocular (Lang, 1970b; 1970 c; Smith, 1971).

Cuando la diferencia de marcha óptica entre ambos rayos corresponde a una cierta longitud de onda, o bien, para un múltiplo de ésta, de manera que coincida en contrafase, ambos cursos se interfieren destructivamente; resultando que el color correspondiente a esta longitud de onda es sustraído del resto de los componentes de la luz blanca. De este modo, todas las longitudes de onda restantes, se mezclan con arreglo a su relación de intensidades para formar un color de fondo que se ha hecho llamar "Color de interferencia".

Sin embargo, como quiera que las relaciones de intensidad entre los distintos colores varían en función de la diferencia de recorrido óptico, a cada diferencia de marcha corresponde un color de interferencia característico (Lang, 1970b; 1970c).

Así, el color de interferencia, o la intensidad en cada punto del campo de la imagen dependerá de la diferencia básica de ambos haces de los rayos parcialmente polarizados, y en consecuencia del espesor y del índice de refracción de los dos puntos del objeto (Plesch, 1971).

3.4.2. Observaciones Generales

La imagen final presenta un característico efecto plástico, parecido al obtenido con la iluminación oblicua (Wunderer y Witte, 1970). Dado que el punto de divergencia de los haces se encuentra en el plano focal del condensador, y el desdoblamiento angular en el prisma de Wollaston, los cursos de luz marchan lateralmente en el espacio correspondiente al objeto. Así, son representados perfiles de superficies, límites ópticos y mecánicos y estrías continuas (Gundlach, 1971).

En este instrumento puede aprovecharse completamente la apertura numérica del condensador. Así, se logra el límite de capacidad de definición y se restringe a un sector estrecho la profundidad de campo en el objeto.

Ello hace posible enfocar distintos planos dentro de la preparación y reproducir estas "secciones ópticas" sin que resulten perturbadas por estructuras que se hallen por encima o por debajo de este plano (Lang, 1970a; Plesch, 1971).

Se obtiene con este tipo de microscopía imágenes ricas en un contraste de color y con información a manera de relieve, dada por una claridad asimétrica en los límites de las estructuras (Arredondo y Martínez, 1978).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente investigación y tomando como modelo a la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (Convolvulacea), es aportar conocimientos sobre la línea clara mediante la utilización de distintas técnicas de microscopía fotónica y de tinción.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante diferentes técnicas de microscopía fotónica la etapa más temprana de detección de la línea clara durante el desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea*.
- 2.- Determinar las técnicas de microscopía fotónica que detectan mejor la línea clara en semilla madura deshidratada de *Ipomoea purpurea*.
- 3.- Comparando los resultados obtenidos dar una posible respuesta a la naturaleza de la línea clara.

5. MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se recolectaron flores y frutos de *Ipomoea purpurea*, en distintas etapas de desarrollo hasta su completa maduración (frutos deshidratados) la colecta se realizó durante el mes de julio de 1993.

De las plantas con flor, se prepararon ejemplares que se depositaron en el herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) para su identificación.

5.1. TECNICA

Las flores y frutos completos, se fijaron en formol-alcohol-ácido acético (FAA). De los frutos se extrajeron las semillas, se midieron y se separaron por tamaños, formando 13 conjuntos, con la finalidad de tener una secuencia en el desarrollo de la semilla.

Las muestras fijadas se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en paraplast a 56°C de acuerdo al método de Johansen (1940).

Se obtuvieron, cortes transversales de 10 μm de grosor por medio de un microtomo de rotación American Optical mod. 820.

5.1.2. Tinciones

Los cortes se desparafinaron y las preparaciones de cada etapa se procesaron de la siguiente manera: a) Sin Teñir, b) se tiñieron con la técnica doble Safranina-Verde Rápido, y c) teñidas con Azul de Toluidina, montándose al final en bálsamo de Canadá.

Las preparaciones se revisaron en el microscopio fotónico American Optical modelo Phase Star y con base en la anatomía de la testa observada se formaron 5 grupos, correspondientes a 5 etapas diferentes del desarrollo de la testa. El criterio utilizado se basó en los resultados del trabajo de Ponce-Salazar, *et al.* (1990)

Una vez establecidas las etapas se procedió a observar las preparaciones con 4 diferentes técnicas de microscopía fotónica: Campo Claro, Contraste de Fases, Polarización y CDI según Nomarski, para luego hacer el registro fotográfico con cada técnica microscópica y con las diferentes técnicas de tinción (sin teñir, azul de toluidina y safranina-verde-rápido) en cada etapa.

La obtención de fotografías se realizó con un fotomicroscopio Carl Zeiss Foml II.

La selección de las distintas técnicas de microscopía fotónica se hicieron considerando que:

el campo claro es la técnica más utilizada en la observación de tejidos vegetales y los reportes sobre línea clara se basan en observaciones realizadas fundamentalmente con esta técnica.

Contraste de fases, porque es una técnica que permite detectar los cambios ópticos en materiales con índices de refracción muy cercanos entre sí.

Polarización, porque va a permitir la detección de actividad óptica y orientación de estructuras con esta propiedad.

CDI según Nomarski, permite la clara visualización de contornos y perímetros.

6. RESULTADOS

6.1 OBSERVACIONES

6.1.1. Etapa I

El primer grupo correspondiente a la etapa I se caracteriza porque la testa está constituida por la epidermis más dos capas celulares producto de la división periclinal de la hipodermis. El resto de la testa está formado por una capa parenquimatosa pluriestratificada. Todas las células en esta etapa presentan núcleo, citoplasma y paredes celulares primarias. (Lámina 1; Figs. 1-12).

6.1.2. Etapa II

La etapa II se caracteriza por una epidermis monoestratificada, la cual se empieza a diferenciar en tricomas, la subepidermis monoestratificada de células vivas y otra capa de 2 ó 3 estratos de parénquima empalizada con células nucleadas de tamaño semejante, y parénquima pluriestratificado, con células con abundantes gránulos de almidón (Lámina 2; Figs. 13-24).

En las etapas anteriores (I y II) consideradas en este trabajo, la línea clara no es observable con ninguna de las técnicas microscópicas y de tinción utilizadas. (Láminas 1 y 2; Figuras 1-24).

6.1.3. Etapa III

Se caracteriza porque la epidermis monoestratificada que se ha diferenciado en tricomas. En la subepidermis monoestratificada con el contenido protoplásmico en degeneración, ya no se aprecian los núcleos, el esclerénquima formado por 3 estratos celulares, cuyas células poseen una longitud variable, siendo las de mayor tamaño las del

estrato adyacente a la subepidermis. En este estrato se observa por primera vez la línea clara en el tercio superior de las esclereidas adyacentes a la subepidermis, las paredes del esclerénquima se empiezan a engrosar y a perder su contenido protoplásmico. Las células del parénquima conservan el almidón pero sólo aquellas adyacentes al esclerénquima, las células parenquimáticas más internas lo han perdido y comienzan a degenerar.

La línea clara se observa por vez primera en la etapa III. Esta etapa corresponde a semillas maduras hidratadas (Lámina 3; Figs. 25-36).

En la etapa III la tinción que resultó más adecuada para la observación de la línea clara fue el azul de toluidina y las técnicas microscópicas: Campo Claro, Contraste de Fases y CDI (Lámina 3; Figs. 29, 30 y 32). La línea clara también se observó, aunque no muy nítidamente, cuando la preparación se tiñó con safranina-verde rápido y aquí el campo claro y el contraste de fases dieron buenos resultados (Lámina 3; Figs. 33, 34).

Cuando las observaciones se hicieron con preparaciones desparafinadas y no teñidas, los resultados no fueron buenos, excepto con la técnica de Nomarski, con la cual la línea clara se observó nítidamente (Lámina 3; Fig 28).

6.1.4. Etapa IV

En esta etapa no hay almidón en el parénquima y las células entran en franca degeneración.

Las células del esclerénquima aumentan el grosor de sus paredes y contienen escaso contenido citoplásmico, la línea clara está presente en el tercio superior del primer estrato de esclereidas adyacentes a la subepidermis.

En la capa subepidérmica la degeneración del citoplasma se acentúa y algunas células epidérmicas se han diferenciado en tricomas.

En la etapa IV que corresponde a semillas maduras en proceso de deshidratación, la línea clara es visible con cualquiera de las técnicas utilizadas, tanto de tinción como de microscopía. Sin embargo la técnica de CDI según Nomarski dió excelentes resultados, ya que la línea clara fue nítidamente observada tanto en preparaciones teñidas con cualquier técnica, como sin teñir (Lámina 4).

La técnica de tinción más favorable para la observación de la línea clara fue el azul de toluidina con cualquiera de las técnicas de microscopía utilizadas, con excepción de la microscopía de polarización, donde su observación no fue nítida.

6.1.5. Etapa V

En esta etapa el parénquima ha degenerado por completo (Figs. 51, 59, y 60), las células del esclerénquima con un aumento en el grosor de sus paredes celulares. El estrato de esclerénquima, adyacente a las células subepidérmicas de mayor longitud que los otros 2 más internos. Las células subepidérmicas contienen en su interior inclusiones oscuras y los tricomas se han desprendido por la manipulación.

La etapa V corresponde a semillas maduras deshidratadas (semillas listas para su dispersión). En esta etapa la línea clara se observa con cualquier tinción o sin ella y con cualquier técnica microscópica. Sin embargo, en esta etapa, la única técnica microscópica favorable para la observación de la línea clara fue la de CDI según Nomarski, que dió excelentes resultados en preparaciones con y sin tinción.

Los resultados con las otras técnicas de tinción y de microscopía no fueron óptimos, ya que las imágenes observadas fueron muy difusas.

Para una definición muy clara de los estratos celulares que constituyen a la testa, la técnica microscópica más adecuada fue el contraste de fases (Lámina 1; Figs 2,6 y10), aún en preparaciones sin teñir (Lámina 1. Fig. 2; Lámina 2. Fig. 14).

La técnica microscópica de campo claro sólo permitió observar estructuras teñidas, pues en las que no tuvieron tinción no hubo definición.

La técnica de polarización permitió además distinguir muy claramente los granos de almidón presentes en las células del parénquima de la testa.

El azul de toluidina tiñó los granos de almidón pudiendo observarse su estructura muy claramente con cualquier técnica de microscopía utilizada.

Con las técnicas microscópicas de polarización y CDI según Nomarski, la línea clara se observa como una línea brillante, sin embargo casi toda la longitud de la esclerelda en la cual se localiza la línea clara, también aparece brillante, aunque un poco menos.

La técnica de Nomarski hizo posible observar un engrosamiento alrededor de todas las esclereldas, localizado justo en el sitio de observación de la línea clara.

En el estrato de esclereldas adyacente a la subepidermis, con la técnica de polarización y Nomarski, podemos observar un cambio de color presentando un tono claro o birrefringente.

LAMINAS

**LAMINA 1. CORTES TRANSVERSALES DE LA TESTA DE *Ipomoea purpurea*.
FIGS. 1-12. AUMENTOS 640 X.**

ETAPA I

Fig. 1. Microscopía de campo claro. Preparación sin tinción.

Fig. 2. Microscopía de contraste de fases. Preparación sin tinción.

Fig. 3. Microscopía de polarización. Preparación sin tinción.

Fig. 4. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación sin tinción.

Fig. 5. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 6. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 7. Microscopía de polarización. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 8. Microscopía de contraste diferencial de Interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 9. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 10. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

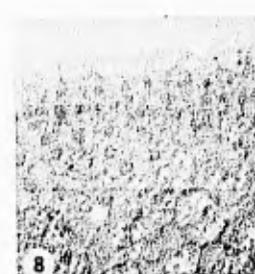
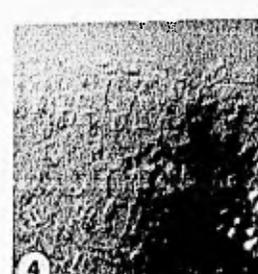
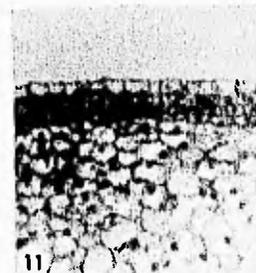
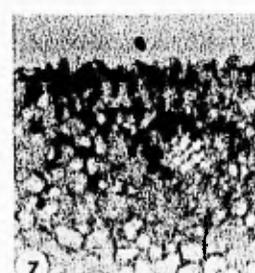
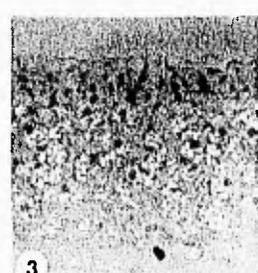
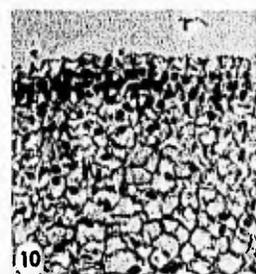
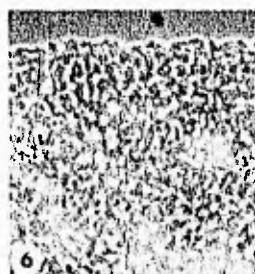
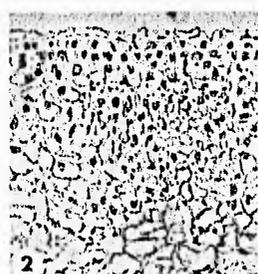
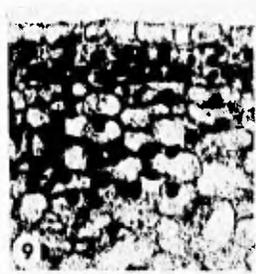
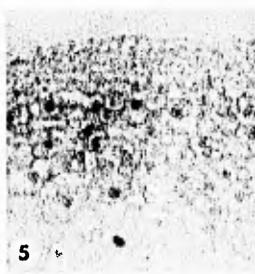
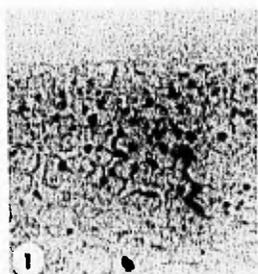
Fig. 11. Microscopía de polarización. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 12. Microscopía de contraste diferencial de Interferencia según Nomarski (CDI).

Preparación con tinción safranina-verde rápido.

LAMINA 1

ETAPA I



**LAMINA 2. CORTES TRANSVERSALES DE LA TESTA DE SEMILLA DE *Ipomoea purpurea*.
FIGS. 13-24. AUMENTOS 640 X.
ETAPA II**

Fig. 13. Microscopía de campo claro. Preparación sin tinción.

Fig. 14. Microscopía de contraste de fases. Preparación sin tinción.

Fig. 15. Microscopía de polarización. Preparación sin tinción.

Fig. 16. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación sin tinción.

Fig. 17. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 18. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 19. Microscopía de polarización. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 20. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción azul de toluidina.

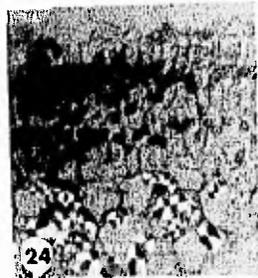
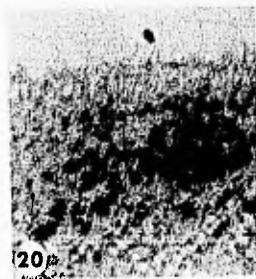
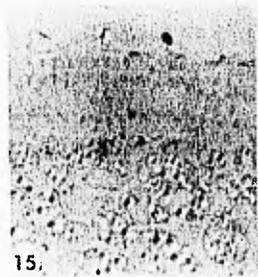
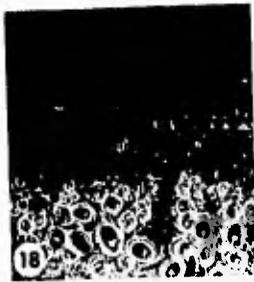
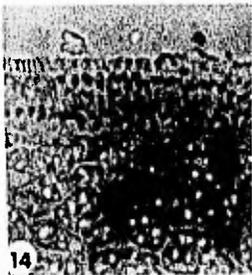
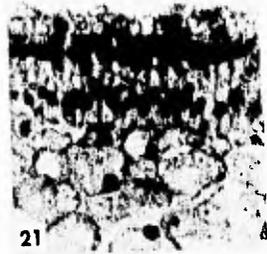
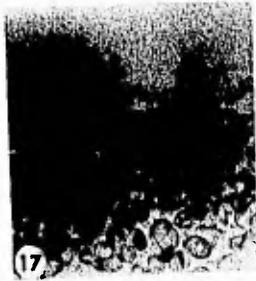
Fig. 21. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 22. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 23. Microscopía de polarización. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 24. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción safranina-verde rápido.

LAMINA 2
ETAPA II



**LAMINA 3. CORTES TRANSVERSALES DE LA TESTA DE *Ipomoea purpurea*.
FIGS. 25-36. AUMENTOS 640 X.
ETAPA III**

Fig. 25. Microscopía de campo claro. Preparación sin tinción.

Fig. 26. Microscopía de contraste de fases. Preparación sin tinción.

Fig. 27. Microscopía de polarización. Preparación sin tinción.

Fig. 28. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación sin tinción.

Fig. 29. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 30. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 31. Microscopía de polarización. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 32. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción azul de toluidina.

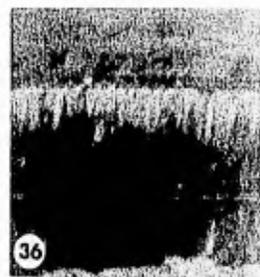
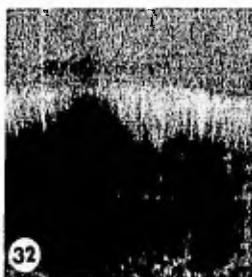
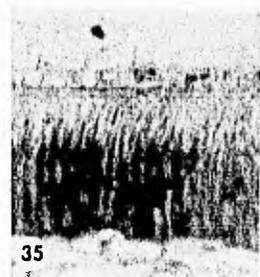
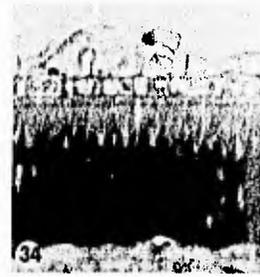
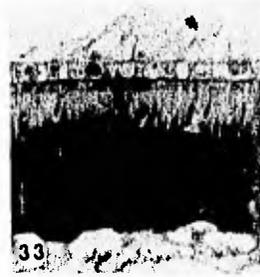
Fig. 33. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 34. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 35. Microscopía de polarización. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 36. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción safranina-verde rápido.

LAMINA 3
ETAPA III



**LAMINA 4. CORTES TRANSVERSALES DE LA TESTA DE *Ipomoea purpurea*.
FIGS. 37-48. AUMENTOS 640 X.
ETAPA IV**

Fig. 37. Microscopía de campo claro. Preparación sin tinción.

Fig. 38. Microscopía de contraste de fases. Preparación sin tinción.

Fig. 39. Microscopía de polarización. Preparación sin tinción.

Fig. 40. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación sin tinción.

Fig. 41. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 42. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 43. Microscopía de polarización. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 44. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 45. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

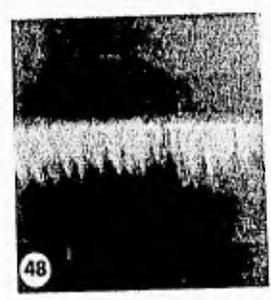
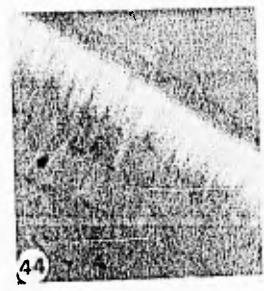
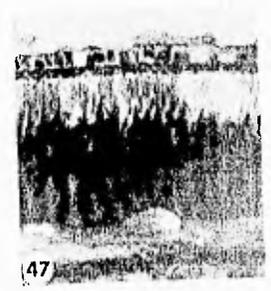
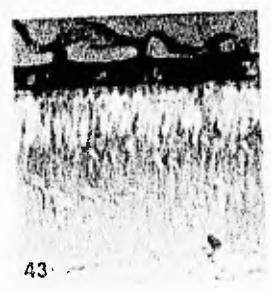
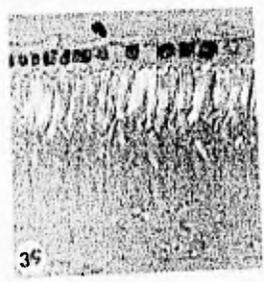
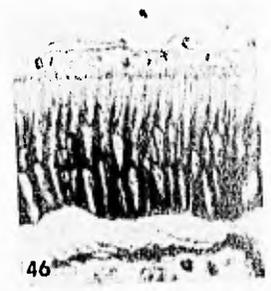
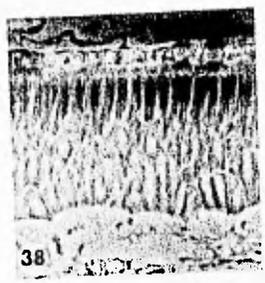
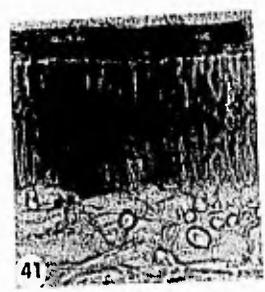
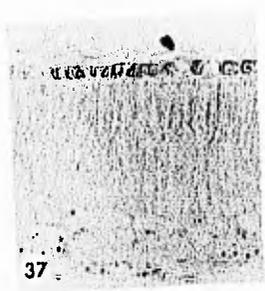
Fig. 46. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 47. Microscopía de polarización. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 48. Microscopía de contraste diferencial de interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción safranina-verde rápido.

LAMINA 4
ETAPA IV

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



LAMINA 5. CORTES TRANSVERSALES DE LA TESTA DE *Ipomoea purpurea*.

FIGS. 49-60. AUMENTOS 640 X.

ETAPA V

Fig. 49. Microscopía de campo claro. Preparación sin tinción.

Fig. 50. Microscopía de contraste de fases. Preparación sin tinción.

Fig. 51. Microscopía de polarización. Preparación sin tinción.

Fig. 52. Microscopía de contraste diferencial de Interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación sin tinción.

Fig. 53. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 54. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 55. Microscopía de polarización. Preparación con tinción azul de toluidina.

Fig. 56. Microscopía de contraste diferencial de Interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción azul de toluidina.

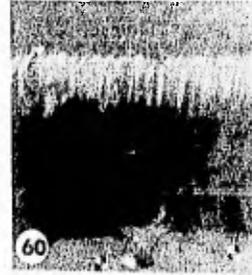
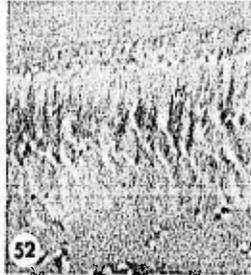
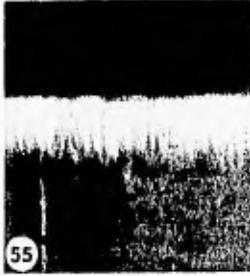
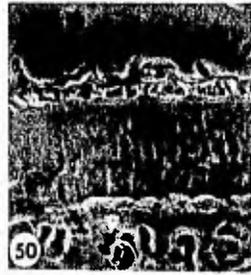
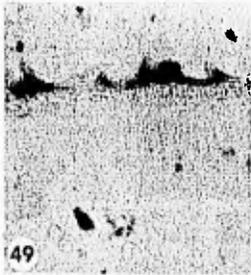
Fig. 57. Microscopía de campo claro. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 58. Microscopía de contraste de fases. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 59. Microscopía de polarización. Preparación con tinción safranina-verde rápido.

Fig. 60. Microscopía de contraste diferencial de Interferencia según Nomarski (CDI).
Preparación con tinción safranina-verde rápido.

LAMINA 5
ETAPA V



CUADROS

OBSERVACIONES DE LA LINEA CLARA EN LA TESTA DE *Ipomoea purpurea*

CUADRO No. 1
ETAPAS I y II

TECNICA/Tinción Microscopía	SIN TEÑIR	AZUL DE TOLUIDINA	SAFRANINA VERDE RAPIDO
CAMPO CLARO	N	N	N
CONTRASTE DE FASES	N	N	N
POLARIZACION	N	N	N
NOMARSKI	N	N	N

LA LINEA CLARA PUEDE OBSERVARSE (S) O NO OBSERVARSE (N). SI SE OBSERVA, LA IMAGEN PUEDE SER NITIDA (+++) MENOS NITIDA (++) O DIFUSA (+)

CUADRO No. 2
ETAPA III

TECNICA/Tinción Microscopía	SIN TEÑIR	AZUL DE TOLUIDINA	SAFRANINA VERDE RAPIDO
CAMPO CLARO	N	S (+++)	S (++)
CONTRASTE DE FASES	S (+)	S (+++)	S (++)
POLARIZACION	S (+)	S (++)	S (+)
NOMARSKI	S (+++)	S (+++)	S (+)

LA LINEA CLARA PUEDE OBSERVARSE (S) O NO OBSERVARSE (N). SI SE OBSERVA, LA IMAGEN PUEDE SER NITIDA (+++) MENOS NITIDA (++) O DIFUSA (+)

**CUADRO No. 3
ETAPA IV**

TECNICA/Tinción Microscopía	SIN TEÑIR	AZUL DE TOLUIDINA	SAFRANINA VERDE RAPIDO
CAMPO CLARO	S (+)	S (+++)	S (+)
CONTRASTE DE FASES	S (++)	S (+++)	S (++)
POLARIZACION	S (++)	S (++)	S (+++)
NOMARSKI	S (+++)	S (+++)	S (+++)

LA LINEA CLARA PUEDE OBSERVARSE (S) O NO OBSERVARSE (N). SI SE OBSERVA, LA
IMAGEN PUEDE SER NITIDA (+++) MENOS NITIDA (++) O DIFUSA (+)

**CUADRO No. 4
ETAPA V**

TECNICA/Tinción Microscopía	SIN TEÑIR	AZUL DE TOLUIDINA	SAFRANINA VERDE RAPIDO
CAMPO CLARO	S (+)	S (+)	S (+)
CONTRASTE DE FASES	S (+)	S (+)	S (+)
POLARIZACION	S (+)	S (+)	S (+)
NOMARSKI	S (+++)	S (+++)	S (+++)

LA LINEA CLARA PUEDE OBSERVARSE (S) O NO OBSERVARSE (N). SI SE OBSERVA, LA
IMAGEN PUEDE SER NITIDA (+++) MENOS NITIDA (++) O DIFUSA (+)

7. DISCUSION

La presencia de la línea clara ha sido descrita en una gran variedad de semillas. Generalmente su presencia se ha asociado con semillas cuya cubierta seminal es impermeable al agua (Hamly, 1935; Watson, 1948; Datta y Biswas, 1970; McKee, 1977; Rolston, 1978; Bevilaqua, 1984; Harris, 1987; Serrato-Valenti, 1979).

La mayoría de los autores atribuyen a Hamly (1935) la descripción de la línea clara en semillas de *Melilotus alba*, sin embargo, hay que hacer notar que Watson (1948) señala: "en algunas semillas de leguminosas Pammel (1899) identifica una línea clara, llegando a reportar semillas con 2 ó 3 líneas claras...". Pammel concluye que la línea clara se presenta como una estructura del cuerpo reproductivo cuyas funciones no han sido determinadas, y señala que la línea clara es el resultado de las propiedades químicas y ópticas de las paredes de las células Malpighianas.

Todas las semillas pertenecientes a la familia Convolvulaceae que presentan línea clara la tienen en la misma posición (Márquez-Guzmán, 1986).

Murcio (1983) y Murguía (1986) reportan la presencia de la doble línea clara en *Ipomoea triloba*, y en las ipomeas arbóreas, respectivamente.

Las observaciones de la testa de *Ipomoea purpurea* realizadas en este trabajo demuestran que la línea clara está siempre presente en semillas maduras, ocurre en un lugar definido y se encuentra en el tercio más externo del primer estrato de esclereidas, adyacente a la subepidermis, estos resultados coinciden con los encontrados en los trabajos de Ponce-Salazar, *et al.* (1990).

López-Curto (1990) y Ponce-Salazar, *et al.* (1990) señalan que durante las primeras etapas del desarrollo de las semillas de *Ipomoea x leucantha* e *Ipomoea purpurea* la línea clara no se observa, es en la etapa madura hidratada, en la que se visualizan cambios que corresponden al engrosamiento de las paredes de las esclereidas y la degeneración del protoplasto. Así mismo, es en esta etapa donde se visualiza la línea clara.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los de Ponce-Salazar, *et al.* (1990), ya que se pudo detectar la línea clara hasta la etapa de semilla madura hidratada, tanto en cortes teñidos como sin teñir; en consecuencia, con las técnicas y métodos utilizados en el presente trabajo sí se detecta la línea clara, pero los resultados no fueron resolutivos desde el punto de vista ontogenético.

Rolston (1978) menciona que varias tinciones han sido usadas para determinar la naturaleza química de los componentes de las macrosclereidas, resultando positivas para pectinas (Coe y Martin, 1920; Raleigh, 1930) lignina (Revees and Valle, 1932; Winter, 1860; McKee, *et al.*, 1977) y suberina (Hamly, 1932; Aitken, 1939; Scott, *et al.*, 1962), han sido reportadas en varias especies.

McKee (1977) en semilla de *Coronilla varia*, utiliza la tinción de safranina-verde rápido, encontrando que la cutícula se tiñe de color café-rojizo muy oscuro con porciones ruborizadas. Este color indica la presencia de depósitos de lignina y taninos. Después de teñir con verde rápido, la cutícula fue casi oscura y las macrosclereidas verdes, excepto la línea clara. La cual fue claramente visible como una reducida línea sin teñirse en el primer estrato de células de macrosclereidas.

Ponce, *et al.* (1990) realizó pruebas histoquímicas en todas las etapas para la detección de almidón (Iugol), polisacáridos insolubles (Ac. Peryódico-reactivo de Shiff, APS), celulosa, hemicelulosa, suberina y/o cutina (cloro-iodo-zinc), lípidos (rojo O de aceite), proteínas (azul mercúrico de bromofenol), lignina (floroglucinol-ac. clorhídrico), taninos (cloruro férrico y permanganato de potasio).

López-Curto (1990) realizó las siguientes pruebas histoquímicas para la detección de almidón (Iugol), polisacáridos insolubles (APS), lípidos (rojo O de aceite) y proteínas (azul mercúrico de bromofenol).

La estructura e histoquímica de la cubierta seminal de *I. purpurea* presenta tres sitios que pueden estar relacionados con la impermeabilidad del agua: 1) la subepidermis de gruesas paredes que dan reacción positiva a lípidos, cutina y suberina; 2) el esclerénquima en empalizada de gruesas paredes, por su reacción positiva a polisacáridos insolubles y a taninos, además por la presencia de la línea clara y 3) la cutícula lipídica que separa la testa del endospermo (Ponce, *et al.* 1990).

Rangaswamy, *et al.* (1985) mencionan que ni la prueba para pentosas, ni las otras pruebas histoquímicas, diferencian a la línea clara como a una estructura distinta.

Mientras que Serrato-Valenti, *et al.* (1994); menciona que en semillas de *Leucaena leucocephala*, la línea clara encontrada es rica en calosa y lo observó con una fuerte inducción fluorescente por azul de anilina.

Hamly (1935); Miller (1967); Chowhury y Buth (1970) y Harris (1983) interpretan a la línea clara como un fenómeno óptico en la interfase de 2 sustancias con diferente índice de refracción.

Respecto a la estructura de la línea clara, hay que hacer notar que pocos fueron los trabajos encontrados. Scott (1961) hace un estudio completo de la semilla de *Cercidium floridium* y en este trabajo se analiza la ultraestructura de la línea clara. El menciona que con microscopía electrónica se pudo observar que el arreglo microfibrilar es paralelo a lo que ocupó el protoplasto, pero a nivel de la línea clara el arreglo microfibrilar presenta un acomodo reticular entrelazándose y formando una estructura en forma de malla.

Ponce-Salazar (1993) propone que en *Ipomoea purpurea* la línea clara resulta de las diferencias en el patrón microfibrilar de la pared celular del estrato de esclereidas subyacentes a la subepidermis y de la composición diferencial de esas mismas células.

Los resultados del presente trabajo indican que en la zona en la que se encuentra la línea clara, existe un mayor engrosamiento de la pared de las esclereidas y mediante la microscopía de polarización se observa una brillantez diferencial entre los estratos de esclereidas, y a lo largo del estrato subyacente a la subepidermis. Este efecto de brillantez, es el resultado óptico de varios factores, por un lado, de la acumulación de materiales ópticamente activos, y por otro de la aparición de la línea de Becke al coincidir cercanamente los estratos con diversos índices de refracción dentro de la línea clara.

Los engrosamientos de estas paredes son fácilmente observados con las técnicas de microscopía de interferencia, en particular con contraste de fases y CDI, debido fundamentalmente a que estos sistemas ópticos brindan imágenes contrastadas de objetos con índice de refracción muy cercanos entre sí (Bennett, 1961; Arredondo y Martínez, 1978). Es importante hacer notar que en trabajos derivados del presente estudio, se encontró que combinaciones de técnicas de microscopía, tales como contraste de fases más polarización

ortoscópica con rotador son combinaciones que se presentan con un rico potencial para las disciplinas morfológicas, en particular para el estudio de materiales con altos índices de refracción y dispuestos en estructuras contiguas en acumulaciones diferenciales como ocurre con la línea clara de *Ipomoea purpurea* (Gamboa, et al. 1994).

Scott (1961) refiere el trabajo de Netolitzky, quien en 1926 encuentra que la zona de la línea clara es una zona de refracción al nivel donde el protoplasto contraído forma un canal al que ellos llaman "cuello de botella". Scott (1961), aplicando microscopía electrónica descubre los cambios ultraestructurales anteriormente señalados. En el presente trabajo se hicieron evidentes estos ensanchamientos gracias a la observación con microscopía de polarización, contraste de fases y CDI. Y fueron observadas con mayor facilidad al utilizar material disgregado con el método de Jeffrey (D'Ambrogio, 1986). Es probable que las muestras de Netolitzky (1926) hayan sido fácilmente observadas con microscopía de campo claro porque las características morfológicas de las semillas por él trabajadas así lo permitieron. Sin embargo, en este estudio, fue evidente que en la cubierta de *I. purpurea* fue necesario teñir y sobre todo observar con técnicas de microscopía menos comunes que el campo claro. Asimismo, es conveniente señalar que en pruebas preliminares de disgregación sí coinciden los resultados con los de Netolitzki (1926).

Los aspectos sobre el desarrollo de la línea clara, han sido poco estudiados, ya que en la literatura consultada se han encontrado solamente 2 trabajos que abordan este tema. Hamly (1935) diserta sobre la estructura en *Mellilotus alba* y Serrato Valenti, et al. (1978) quienes abordan la estructura de *Cercis siliquastrum*. Sin embargo, en ambos trabajos no se contemplan los aspectos del desarrollo de la línea clara; en nuestro país, tampoco se ha

abordado esta temática, pero López-Curto (1990) y Ponce, *et al.* (1990) analizan la estructura de la semilla de *Ipomoea purpurea* e *Ipomoea x Leucanta*. En el presente trabajo se dividió por etapas el proceso de maduración de *I. purpurea* en 5 etapas y de acuerdo a los resultados se encuentra que la línea clara se manifiesta en la etapa III. Ponce, *et al.* (1990) señala la aparición de la línea clara en la etapa V y VI, esto, desde luego, marca una diferencia entre los resultados de este trabajo y la discusión de Ponce (*op cit*). Es probable que estas diferencias en cuanto a etapas, se deban principalmente a que en el trabajo de Ponce se busca el desarrollo de la testa, desde antes hasta semilla madura deshidratada como uno de los objetivos principales de dicho trabajo. En tanto que, uno de los objetivos del presente trabajo fue analizar sólo la línea clara, y dadas las diferentes metodologías empleadas, es claro que Ponce haya determinado 7 etapas y que en este trabajo sólo se determinaron 5 etapas.

La combinación de técnicas de microscopía fotónica con tratamientos de tinción (Azul de toluidina y Safranina-Verde Rápido) es un aporte del presente trabajo ya que hasta ahora en la literatura consultada no se encontraron trabajos semejantes, aunque Harris (1985) ya hace observaciones con esta técnica (Safranina-Verde Rápido), aunque no destaca las ventajas o desventajas de aplicar esta técnica en los estudios morfológicos. No se encontraron antecedentes de la aplicación de las técnicas de contraste de fases ni de polarización ortoscópica. Desde luego la microscopía de campo claro ha sido la más utilizada para los estudios morfológicos de estructura y desarrollo de testa de semilla.

Al aplicar la técnica de campo claro para la observación de las preparaciones de la testa de *Ipomoea purpurea* sin teñir, los resultados esperados se manifestaron en imágenes muy pobres en contraste y consecuentemente, la información de la estructura fue muy

deficiente, por lo que resulta evidente, que la microscopía de campo claro no es del todo recomendable para observar tejidos sin teñir y con diferencias mínimas de índice de refracción entre el medio que les rodea y el resto de sus estructuras. En el presente trabajo la línea clara fue detectada en preparaciones teñidas y observadas bajo el microscopio de campo claro, es importante mencionar que en la literatura consultada es la forma de observación más utilizada (Hamly, 1935; McKee, 1977; Rolston, 1978; Rangaswamy y Nandakumar, 1985; Harris, 1987; Ponce-Salazar, *et al.* 1990; López-Curto, *et al.* 1990; Bevilaqua, *et al.* 1985).

De la aplicación del método de contraste de fases, se obtuvo una imagen rica en contrastes de intensidad luminosa, siendo ésta el resultado de la traducción de los cambios de densidad óptica, donde destacan estructuras poco o nulamente visibles bajo otros sistemas ópticos y de iluminación; así, bajo este método la línea clara de la testa de *Ipomoea purpurea* se ve negra, debido a que en esta parte la mayor densidad y probablemente el aumento en grosor de esta estructura induce un defasamiento aproximado de 180° de longitud de onda provocando que se vea oscura, pudiendo observarse bajo cualquier técnica de tinción.

Casartelli (1967) menciona que en general, las placas de fase están diseñadas para producir una fase positiva, es decir, para que las partes más gruesas y de mayor refracción del objeto aparezcan oscuras.

En todas las imágenes obtenidas por medio de este procedimiento, se produce un halo de difracción alrededor de los objetos, el cual impide determinar y desenmascarar el límite de las estructuras. Dicho halo es el producto para que en este instrumento, no se logre una completa separación entre los rayos directos y difractados. En sí este halo, es más pronunciado

al ser más brusca la transición entre las densidades ópticas del medio al objeto (Arredondo y Martínez, 1978).

Al aplicar el procedimiento de polarización al estudio de la testa de *Ipomoea purpurea*, se obtuvo una imagen de fondo oscuro donde solamente destacan los gránulos de almidón, por lo que se hizo necesario aplicar el rotador de 1λ , que de acuerdo a sus características físicas impone un retardo de 550 nm (Patzelt, 1974), lo que proporciona un color rojo de interferencia de primer orden en el fondo del campo visual, los pequeños retardos se traducen en colores de diferente magnitud. Así la técnica de polarización sólo nos permitió la localización de estructuras anisotrópicas.

Con el procedimiento de CDI según Nomarski, se obtuvieron imágenes ricas en contraste de color, y con información a manera de relieve. Dada por una claridad asimétrica en los límites de las estructuras. Por lo que podemos decir que se observan depresiones y relieves.

En el microscopio de CDI según Nomarski, la imagen se contrasta en relación directa con la diferencia de marcha óptica introducida por las estructuras, mientras que en el contraste de fases se incrementa un halo de difracción.

La línea clara, dependiendo de la técnica de microscopía con la que se observa, se puede interpretar de diferentes formas: con microscopía fotónica, se puede decir que es un fenómeno óptico producido por la yuxtaposición de dos materiales con diferente índice de refracción produciendo una línea de Becke (Hamly, 1935), mientras que con microscopía electrónica de transmisión a nivel de línea clara se observa un cambio reticular en el arreglo microfibrilar de las paredes del esclerénquima (Scoat, 1961). A través del microscopio

electrónico de barrido se interpreta como el producto de una modificación estructural producida por el paulatino adelgazamiento del lumen de las células de Malpighi de las leguminosas que forman líneas de Becke por el diferente índice de refracción entre la pared y el lumen celular (Serrato-Valenti, *et al.* 1979). A pesar de la información hasta ahora obtenida podemos decir que el problema de la naturaleza de la línea clara se ha mantenido por mucho tiempo, sin una respuesta definitiva, dado que los diversos investigadores han tratado de abordarlo sustentándose solamente en alguna técnica. Actualmente, parece ser, que reuniendo toda la información es posible proponer una interpretación que contemple diversos enfoques: químicos, físicos y estructurales.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Durante el desarrollo de *Ipomoea purpurea* la línea clara se detectó por primera vez en semilla madura hidratada (etapa III).
- 2.- La tinción más favorable fue la de azul de toluidina, con microscopía de campo claro, contraste de fases y contraste diferencial de interferencias en las etapas III, IV y V
- 3.- En cortes no teñidos, sólo con contraste diferencial de interferencia según Nomarski se pudo detectar la línea clara.
- 4.- Con polarización y contraste diferencial de interferencia según Nomarski, se detectó que la línea clara corresponde a un engrosamiento de la pared del primer estrato de esclereidas y corresponde a un depósito mayor de los materiales que la forman.

9. BIBLIOGRAFIA

- Arredondo, J.A y A. Martínez. (1978). La Microscopía Óptica en el estudio de los Protozoarios de vida libre. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Arnold, C.R. y P.J. Rolls. (1974). Fotografía Aplicada. Ed. Omega. Barcelona. 583 pp.
- Ballard, L.A.T.(1973). Physical barriers to germination, *Seed Science and Technology*, 1, 285-303.
- Barer, R. (1955). Phase Contrast and Polarization Microscopy. In: Mellors, R.C. (ed.) *Analytical Cytology*. Academic Press. London: 3/1-3/94.
- Bayer, A. y Allen, R.D. (1966). Structure and Organization of living Mitotic Spindle of *Haemanthus* of Endosperm. *Science* 151: 572-574.
- Bargmany, W. (1966). *Histología y Anatomía Microscópica Humana*. Edit. Labor Barcelona Madrid. 630 pp.
- Bennet, H.S. (1961). The Microscopic Investigation of Biological Materials with Polarized Light. In: Mc Clung J.,R., *Microscopical Techniques*. Hafner Publisher Co. New York: 591-667.
- Bevilacqua, R.; Roti-Michelozzi and Serrato Valenti. (1985). Barriers to water penetration in *Cercis siliquastrum* seeds. *Seed. Sci. and Technol.* 13:175-182.
- Bhojwani, S. S. and S. P. Bhatnagar. (1981). *The Embriology of Angiosperms*. Vikas Publishing House PUT. LTD. Delhi. 285 pp.
- Bidwell, R.G.S. (1979). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, México. 784 pp.
- Burns, M.D. (1975). *Physics for Biology and Pre-medical Students*. Addison-Wesley. London. 229-242 y 341-366.
- Casartelli, J.D.(1968). *Microscopía Teórico-práctica*. Urmo. Bilbao. 182 pp.
- Castro, M.E. (1976). Distribución, biología y combate de Correhuela (*Ipomoea purpurea* L. Roth) y meloncillo (*Cucumis melo* L. Aff. *agrestis* Naudin), en los cultivos de maíz y sorgo de la región Norte de Tamaulipas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". México 78 pp.
- Clark, L.G. Ed. (1961). *The Encyclopedia of Microscopy*. Reinhold Pub. Corp. New York, USA. 693 pp.

- Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Allen Press. U.S.A. 555 pp.
- Datta, S.C. and K.K. Biswas (1970). Germination regulating Mechanisms in aquatic angiosperms. Part. I *Ipomoea aquatica* Forsk. *Broteria Ser. Cienc. Nat.* 39 (3-4): 175-185.
- D'Ambrogio, A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. 1a. ed. Hemisferio Sur. Buenos-Aires, Argentina. 83 pp.
- De Robertis, P., Nowinski, W.W. y Saez, F. (1971). *Biología Celular*. 8a. ed. El Ateneo. Buenos Aires: 74-81.
- Determann, H. (1971). *El microscopio y su aplicación*. Leitz, Wetzlar. 108 pp.
- Díaz, J. (1976). *Usos de las Plantas Medicinales de México*. Monografías Científicas. IMEPLAN. 135 pp.
- Donald, F.(1970). *Introducción a los métodos de Cristalografía Óptica*. 2a. ed. Omega. Barcelona. 314 pp.
- Edie, H.H. and B.W.C., Ho. (1969). *Ipomoea aquatica* as a vegetable crop in Hong Kong. *Economic Botany* 23 (1): 32-36.
- Esau, K. (1965). *Plant Anatomy*. De. John Wiley & Sons. New York. pp: 308-337.
- _____. (1987). *Anatomía de las plantas con semilla*. Hemisferio sur, Uruguay. 512 pp.
- Francon, W. (1961). *Progress in Microscopy*. Pergamon Press. New York: 64-90.
- Gamboa, A., Martínez-Mena, A. y Márquez-Guzmán, J. (1994). Detección de la línea clara en la testa de *Ipomoea purpurea* mediante diversas técnicas de tinción y microscopía Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Botánica. Mar del Plata, Argentina. 37 pp.
- Govil, M.C. (1970). Morphological studies in the family Convolvulaceae. Development and structure of the seed coat. *J. Indian Bot. Soc.* 50 : 32-39.
- Gundlach, H. (1971). Sobre la aplicación de la microscopía de contraste de fases y contraste diferencial de interferencias en la citología vital ginecológica. *Rev. Zells* 19: 17-18.
- Hale, J.A. (1958). *Interference Microscope in Biological Research*. E. and S. Livingstone L.T.D. London 114 pp.
- Hamly, D.A. (1932). Softening of the seeds of *Melilotus alba* *Botanical Gazette* 93: 345-375.

- _____. (1935). The light line in *Melilotus alba*. Botanical Gazette (96) 755-757.
- Johansen, D.A. (1940). Plant microtechnique. Mc Graw Hill. New York. 523 pp.
- Jos, J.S. (1963). The Structure and Development of Seeds in Convolvulaceae: *Ipomoea* species. Agra. University Journal of Research 12: 247-260.
- Kaur, H. (1969). Structure and development of seeds in *Ipomoea obscura*. Ker-Gawl. J. Indian Bot. Soc. 47: 346-351.
- _____ y R.P. Singh. (1970). Structure and development of seeds in three *Ipomoea* species. J. Indian Bot. Soc. 49: 168-174.
- Lang, W. (1970)a. El Dispositivo de Interferencias según Nomarski. Rev. Zeiss. No. 70: 112-113.
- _____. (1970)b. Microscopio Diferencial de Interferencias según Nomarski. Parte I: Fundamentos físicos del procedimiento. Rev. Zeiss. No. 70: 114-120.
- _____. (1970)c. Microscopio de Contraste Diferencial de Interferencias según Nomarski. Parte II. Obtención de la Imagen de Interferencia. Rev. Zeiss No. 71: 12-17.
- _____. (1971)d. Microscopía de Contraste Diferencial de Interferencias según Nomarski. Parte III, Comparación con el método de Contraste de Fases. Rev. Zeiss. No. 76: 69-70.
- Langeron, M. Locquin, M. (1978). Manual de Microscopia. Edit. Labor. Barcelona.
- Larqué, S.A. y Trejo, L.C. (1990). El agua en las plantas: manual de prácticas de fisiología vegetal. Trillas, México. 360 pp.
- Lawson, D. (1972). Photomicrography. Academic Press. London: 494 pp.
- López-Curto, M.L. (1987). Estudio del ciclo de vida y del desarrollo de la semilla de *Ipomoea x Leucantha* (Convolvulaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Lute, A.W.(1928). Impermeable seeds of alfalfa. Colorado Experimental Station Bulletin No. 326.
- Mac Donald, J.A. (1982). Biosystematics of the *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Ph. D. Diss., University of Texas Austin, Texas.
- McKee, G.W. (1977). Seed coat structure In *Coronilla varia* L. and its relations to hard seed. Agronomy Journal 69: 53-57.

- Marbach, I. and A.M. Mayer. (1974). Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiol.* 54: 817-820.
- _____ and A.M. Mayer. (1975). Changes in catechol oxidase and permeability to water in seed coats of *Pisum elatius* during seed development and maturation plant. *Physiol.* 56 93-96.
- Márquez-Guzmán, J. G. (1986). Anatomía e Histoquímica del desarrollo de la semilla de *Turbina corymbosa* (L.) (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.
- _____ y G. Laguna-Hernández. (1982). Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corymbosa* (L.) *Raf. Convolvulaceae PHYTON* 42(1): 1-8.
- Martin, L.C. (1971). The light Microscope. In: Oster, G. (ed.) *Physical Techniques In Biological Research*. Academic Press. New York: 2-70.
- Maurer, J.F. Ed. (1986). *Concise dictionary of Scientific Biography*. Ed. Charles Scribner's Sons. USA. 773 pp.
- Murcio, E. (1983). Estudio anatómico y citoquímico de la semilla madura de *Ipomoea triloba* (Convolvulaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Murguía-Sánchez, G. (1986). Estudio comparativo de semillas maduras de 2 especies arbóreas del género *Ipomoea* (Convolvulaceae) Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Núñez-Mariel, C. (1992). Presencia de laticíferos en embriones de once generos de Convolvulaceas Mexicanas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM. México.
- Osterberg, H. (1955). Phase and Interference Microscopy. In: Oster, G (ed). *Physical Techniques in Biological Research*. Vol. I. Academic Press. London: 378-437.
- Patzelt, W.J. (1974). *Microscopio de Polarización*. Leitz Wetzlar. Alemania: 115 pp.
- Piesch, E. (1971). El empleo de la microscopía de contraste diferencial de Interferencias para registrar trazos nucleares en cuerpos sólidos. *Rev. Zeiss.* 18: 58-59.
- Ponce-Salazar, M., J. Márquez-Guzmán, A. Brechú-Franco, G. Laguna-Hernández. (1990). Desarrollo e Histoquímica de la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. (Convolvulaceae) y su relación con la impermeabilidad al agua. *PHYTON* 51(1): 5-12.
- _____, E. M. Engleman, J. Márquez Guzmán y B.U. Centeno. (1993). Estudio de la línea clara en la testa de *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). *Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica*. 213 pp.

- Quinlivan, B.J. (1971). Seed coat impermeability in legumes. The journal of the Australian Institute of Agricultural Science 37: 283-295.
- Raleigh, G.J. (1930). Chemical conditions in maturation dormancy and germination of seeds of *Gymnocladus dioica* Bot. Gaz. 89: 273-294.
- Raven, H.P., F.R. Evert, S.E. Eichhorn. (1986). Biology of plant. Four Edition. Worth Publisher, Inc. New York. 775 pp.
- Richards, O. (1961). Phase Microscopy. In McClung-Jones R. (ed.) Microscopical Techniques. Hafner. New York: 687-695.
- Rolston, M. P. (1978). Water impermeable seed dormancy. The Botanical Review 44(7): 365-396.
- Ross, K.F.A. (1967). Phase Contrast and Interference Microscopy for Cell Biologists. Arnold Publishers. London. 225 pp.
- Rzedowski y Rzedowski. (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México, 1a. Edición. Instituto de Ecología D.F. México. 674 pp.
- Sampathkumar, R. and K.R. Ayyangar. (1982). Seed Morphoanatomy of Convolvulaceae. J. Indian Bot. Soc. 61: 346-354.
- Scott, F.M.; Bystrom, B.G. and Bowler, E. (1961). *Cercidium floridium* seed coat, light and electron microscopy study. American Jour. Bot. Los Angeles California. 821-833 pp.
- Serrato-Valenti, G.; Roti-Michelozzi, G. and Ghigliazza, P. (1979). Sviluppo del tegumento seminale in *Cercis siliquastrum* L. con particolare riguardo all'insorgenza ed alla struttura della linea lucida. Nota preliminare.-Giorn. Bot. italia. 113(1-2): 101-115.
- _____, P. Modenesi, G. Rosti-Michelozzi & L. Bevilacqua. (1994). Testa Structure and Histochemistry Related to Water Uptake in *Leucaena leucocephala* L. Annals of Botany. 73:531-537.
- Shurcliff, W.A. (1968). Luz Polarizada. Reverté. México: 1-89.
- Smith, R.F. (1971). Color Contrast Methods in Microscopy and Photomicrography. Part III. The Nomarski Interference Microscopes. Bull. Phot. Appl. Sci. Tech. and Med. 5: 19-23.
- _____. (1990). Microscopy and photomicrography. A working manual. Ed. CRC Press. New York. 133 pp.
- Sripleng, A. and F.H. Smith. (1960). Anatomy of the seed of *Convolvulus arvensis*. American Journal of Botany 47: 386-392.

- Stoves, J.L. (1957). *Fibre Microscopy*. National Trade Press. London. 286 pp.
- Tiwari, N.C. and V. Chandra. (1985). Water spinach: its varieties and cultivation. *Indian Horticulture* 30 (2): 23-24.
- Tolansky, F.R.S. (1968). *Interference Microscope for the Biologist*. Charles and Thomas Publishers. Springfield. 166 pp.
- Valdovinos, G. (1992). "Estructura e Histoquímica del Desarrollo de la Semilla de 3 variedades de *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae)". Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. UNAM. México.
- Vázquez-Yañez, C. y B. Pérez-García. (1976). "Notas sobre la Morfología y Anatomía de la testa de las semillas de *Ochroma lagopus*". *Turrialba* 26(3): 310-311.
- Watson, D.P. (1948). Structure of the testa and its relation to germination in the Papilionaceae tribes Trifoliales and Loteae. *Annals of Botany* 12: 385-409.
- White, D.S. (1974). *Biological Physics*. Chapman and Hall. London: 212-213 pp.
- Wilson, M.B. (1976). *The science and art of basic Microscopy*. Amer. Soc. Med. Tech. USA. 64 pp.
- Wong, G. (1991). Influencia de la temperatura en la ruptura de la latencia de semillas de *Ipomoea purpurea* y de *Sicyos deppel*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México.
- Woodcock, F.E. (1942). Seed development in the morning glory (*Ipomoea rubrocaerulea* Hook). *Papers Mich. Acad. Sci. Arts. and letters*. 28: 209-212.
- Wunderer, A. y Witte, S. (1970). Acerca del empleo de la microscopía de interferencia en la Citología. *Rev. Zeiss*. 70-121-123.