



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"PROLIFERACIÓN CELULAR Y SUS POSIBLES LIMITACIONES
INTERNAS EN EL MERISTEMO APICAL DE LA RAÍZ CON
CRECIMIENTO DETERMINADO
(*Stenocereus gummosus*, CACTACEAE)"**

**Tesis de licenciatura que
para obtener el título de
BIÓLOGA
PRESENTA**

María del Jazmín Aguilar Medina



Director de tesis Dr. Joseph Dubrovsky

2000

277453



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

realizado por Amalier Medina María del Jazmín
con número de cuenta 0922322-4 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Joseph Dubrovsky

Director de Tesis

Propietario Dr. Joseph Dubrovsky Jurnovski

Propietario Biol. M. Raquel Gonzalez Avalos

Raquel Gonzalez
~~Propietario~~

Propietario Biol. Jerónimo Reyes Santiago

Suplente D. M. C. Helia Reyna Osuna Fernandez

Helia Reyna Osuna

Suplente M. C. Irene Sánchez Gallo

Irene Sánchez Gallo

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Dr. Edna María Suárez D.
Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suárez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicatorias.

A mi madre , por su eterna confianza.

A mis compañeros participantes en esta huelga que no termina aún.

A todos mis amigos con quienes he compartido muchas experiencias.

A todas las mujeres quienes han luchado y luchan por un mundo más justo y humano.

Agradecimientos

Agradezco a mi madre y mi familia, porque lo que soy ahora lo soy gracias a ellos.

Agradezco a mi asesor el Dr. Joseph Dubrovsky quien me enseñó como hacer ciencia y con su ejemplo me mostró que cada persona puede ser lo que se proponga si lo hace con tesón.

Agradezco especialmente a cinco personas quienes influyeron para que yo pudiera realizar esta tesis en la Paz; Juanca, Janette, Alma, Ramiro, y Violeta valiente amiga de todas las batallas.

Agradezco al Conacyt y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las becas otorgadas para la realización de esta tesis.

Agradezco a todos mis amigos del CIB en especial a Karina, Alejandra, Gabi, Carmen, Ivonne, Norma, Raúl, Vico, Jesús, Sergio, Sandra, Chayito y Cesar, por su valiosa amistad y apoyo, los recuerdo siempre.

Agradezco a todos los investigadores y trabajadores del Cibnor, por su ayuda en la realización de esta tesis, también es su esfuerzo, en especial a García-Carreño por permitirme utilizar parte de su equipo, a María Esther Puente, por el material que me brindó, y a una mujer a quien admiro Alejandra Nieto, por darme un hogar.

Agradezco a mis sinodales y profesores M. en C. Irene Sánchez, a la Dr Reyna Osuna, y a los Biólogos Raquel Ávalos y Jerónimo Reyes, por sus valiosos comentarios y ayuda en la conclusión de ésta tesis.

A mis Amigos de la Paz con quienes forme una familia más, Oscar, Aaron, Cristina Tito, Tony, y Paul.

A mis amigos del alma y de batalla a quienes quiero mucho y quienes siempre estuvieron en mi memoria Ricardo, Paty, Angel, Tamara, Rosalba, Marcela, Violeta y Ninel.

A mis adorados L. A. J. M. y R. siempre están en mis recuerdos.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1.1.- Descripción de <i>Stenocereus gummosus</i>	10
1.2.- Características de la zona de recolección de semillas.....	12
2.- Objetivos.....	13
3.- Materiales y métodos.....	14
4.-Resultados y discusión.....	24
6.- Conclusiones.....	56
7.- Referencias bibliográficas.....	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.....	34
Tabla 2.....	36
Tabla 3.....	38
Tabla 4.....	39
Tabla 5.....	46
Tabla 6.....	48
Tabla 7.....	50
Tabla 8.....	51
Tabla 9.....	52
Tabla 10.....	53
Figura 1.....	3
Figura 2.....	11
Figura 3.....	23
Figura 4.....	27
Figura 5.....	28
Figura 6.....	30
Figura 7.....	31
Figura 8.....	33
Figura 9.....	35
Figura 10.....	37
Figura 11.....	41
Figura 12.....	42
Figura 13.....	43
Figura 14.....	45
Figura 15.....	47
Figura 16.....	49

RESÚMEN

La fisiología de crecimiento de las Cactáceas y particularmente la raíz es poco conocida. El estudio del crecimiento de la raíz permitirá mejorar la comprensión de los mecanismos de adaptación de este tipo de plantas. Este trabajo tuvo como objetivo principal caracterizar la actividad proliferativa y evaluar si existen limitaciones internas en el desarrollo del meristemo apical de la raíz primaria con crecimiento determinado de *Stenocereus gummosus*. Esta caracterización se realizó mediante la observación directa del crecimiento de la raíz primaria, tomando en cuenta la longitud de la raíz, la longitud de las células y el número de células en una fila, en diferentes condiciones experimentales. Se observó que el crecimiento de la raíz fue promovido en condiciones óptimas de crecimiento con un pH ácido y la aplicación combinada de los fitorreguladores Ácido indolacético y Zeatina. Sin embargo el número de ciclos celulares no tuvo un incremento significativo. El patrón de crecimiento determinado no fué modificado en ninguno de los tratamientos analizados (se utilizaron distintas concentraciones de auxinas (AIA), citoquininas (Zeatina), combinaciones de ambas, temperatura y pH) Esto indica que el patrón de crecimiento determinado representa un programa de desarrollo y que las limitaciones (ausencia de mantenimiento del meristemo) son parte de este programa. Estas limitaciones internas de crecimiento y la rápida conclusión de la actividad meristemática observada en el meristemo apical de la raíz primaria podría tener un fuerte impacto en el rápido establecimiento de las plántulas, ya que estas deben aprovechar la escasa precipitación pluvial típica en el árido habitat natural. Este patrón de crecimiento representa una característica importante de adaptación de la planta a un ambiente árido y no simplemente una respuesta a la sequía. La estabilidad de éste programa de desarrollo implica que el crecimiento determinado es controlado genéticamente y conservado durante la evolución de la especie estudiada.

1. INTRODUCCIÓN

Las regiones áridas y semiáridas ocupan en nuestro país el 67.35 % del territorio nacional (Rzedowski, 1978). En estas zonas la poca precipitación pluvial -menos de 600 mm anuales- (Evenary, 1985), es el principal factor limitante para el desarrollo de la vegetación, por lo que el estudio de la fisiología de las plantas nativas de estos ambientes es importante para la comprensión y el mantenimiento de dichos ecosistemas, así como su utilización para la reforestación, la prevención de la erosión y la agricultura. Los ambientes áridos se caracterizan por poseer baja disponibilidad del agua, agudizada por la variabilidad de la precipitación pluvial, intensa radiación solar, altas tasas de evaporación, vientos fuertes y secos, cambios bruscos de temperatura durante el día y deficiencias de nutrimentos minerales en el suelo (Pimienta, *et al* 1995). Distintas familias de plantas, entre ellas las Cactáceas, han respondido a lo largo de su evolución con modificaciones anatómicas y fisiológicas como bajas tasas fotosintéticas, crecimiento vegetativo lento, crecimiento reproductivo asincrónico, cutícula gruesa, baja densidad de estomas en los tallos fotosintéticos y el metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, que consiste en realizar la apertura estomática y la obtención de bióxido de carbono durante la noche evitando así la pérdida de agua durante el día, a diferencia de la ruta metabólica C_3 utilizada por las plantas de climas templado-húmedos también conocidas como mesófitas (Nobel, 1988).

La mayoría de las investigaciones fisiológicas en Cactáceas utilizan el tallo de la planta como sistema experimental. Sin embargo la raíz es también un buen sistema ya que permite estudiar la relación entre la división y la expansión celular durante el desarrollo de las plantas (Schiefelbein, 1997), sin embargo ha sido poco estudiada. Su anatomía es relativamente simple, el límite entre la zona meristemática y la de elongación es clara, además de que ocurren numerosas mitosis y las raíces

de plántulas pueden ser tratadas con muy diversas sustancias en tiempos relativamente cortos (Ivanov, 1981).

Fisiología y desarrollo de la raíz.

La raíz es el primer órgano que emerge de la semilla y lleva a cabo la absorción de nutrimentos y agua, fijación al sustrato, y síntesis de sustancias necesarias para el funcionamiento de toda la planta. La interfase (el espacio entre la raíz y el suelo) es el sitio en donde más interacciones ocurren entre las plantas y su ambiente al darse un intercambio nutricional e hídrico (Kafkafi y Waisel, 1995). El sistema radical está constituido por diversos tipos de raíz. La primera raíz desarrollada por la planta se llama raíz primaria o radícula, y a partir de ésta se desarrollan las raíces laterales. En algunos casos, del tallo se desarrollan raíces adventicias, raíces subterráneas o aéreas. Si se observa un corte transversal de la raíz primaria (Fig. 1) puede distinguirse una separación clara entre los grupos de tejidos que posee; la epidermis, el córtex y el sistema vascular (Esau, 1960). Clásicamente, la raíz ha sido dividida dentro de cuatro zonas: la caliptra, el meristemo apical, la zona de elongación y la zona de pelos radicales o zona de maduración, sin embargo, a excepción de la caliptra, las fronteras de estas zonas se sobrelapan considerablemente. La caliptra es una estructura protectora constituida por células parenquimáticas vivas generadas por la actividad del propio meristemo, que al producir células, las más viejas son desplazadas progresivamente a la punta, ayudando en la penetración de la raíz y protegiendo el meristemo apical de los daños mecánicos. El meristemo apical está formado por células isodérmicas y la división de estas células progenitoras genera todas las células de la raíz. Dentro de este meristemo apical se encuentra un grupo de células meristemáticas llamadas centro quiescente, en donde las células no se dividen frecuentemente y el índice mitótico es

muy bajo (Ivanov, 1981), y aunque es poco clara la función de éste, se cree que es un reservorio de células, las cuales se replican ante la pérdida de células en la raíz por algún daño. La zona de elongación, como su nombre lo indica es el sitio de rápido crecimiento de la raíz, las células de esta zona son de forma rectangular, después que la división y la elongación celular han concluido, las células maduran produciendo filas de células de diferentes tipos (Taiz, 1991). Los estudios realizados con raíces en diferentes especies señalan que los linajes de éstas son guiados en gran medida por la señalización que es establecida durante la embriogénesis y mantenida durante el desarrollo postembrionario; en muchas raíces, dichos linajes celulares son fácilmente identificados como columnas organizadas longitudinalmente, resultado de repetidas divisiones transversales en la región meristemática (Schiefelbein *et al*, 1997).

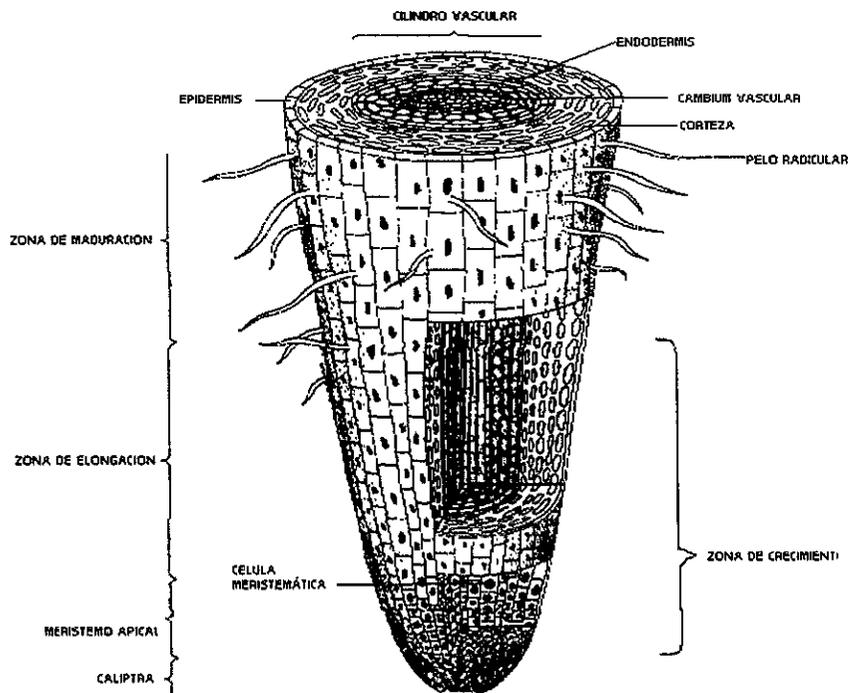


Figura 1.- Corte transversal de raíz

Crecimiento y desarrollo de la raíz.

El crecimiento es entendido como el incremento irreversible de tamaño, el cual es resultado de la división y el alargamiento celular. La diferenciación es el cambio en forma y complejidad de un organismo o parte de él, desde su origen hasta la madurez. El crecimiento y la diferenciación de las células, tejidos y órganos es un componente esencial del desarrollo de las plantas (Salisbury, 1992).

El crecimiento de las células meristemáticas de la raíz es relativamente lento, incrementando su longitud en sólo el doble durante un periodo de ciclo celular, mientras que al crecer por elongación, su tamaño aumenta hasta veinte veces durante el mismo tiempo (Ivanov, 1994).

Los meristemas constituyen tejidos integrales, en donde las velocidades y los planos de la expansión y la división celular son los responsables de la anatomía específica de los tejidos que producen. Los meristemas apicales de raíz y tallo se forman durante el desarrollo embrionario, por esto son nombrados meristemas primarios. El cambium vascular y las zonas meristemáticas de los nodos y la base de las hojas son indistinguibles hasta después de la germinación, éstos son llamados meristemas secundarios (Salisbury, 1992). El meristemo apical de raíz genera los tejidos primarios y establece y mantiene la organización estructural y funcional de este órgano (Webster y MacLeod, 1996). Cuando la actividad meristemática en dicha zona de la raíz es mantenida normalmente durante toda la vida de la planta, el tipo de crecimiento es considerado como crecimiento indeterminado, en el cual no hay un límite en el número de ciclos celulares, como es el caso de los tallos vegetativos y raíces que crecen durante toda la vida de la planta (Salisbury, 1992), a diferencia de lo que ocurre en las raíces de plantas con crecimiento determinado.

Crecimiento determinado.

El crecimiento puede ser determinado, con ciertas limitaciones internas de crecimiento y por lo tanto, después de adquirir una talla y edad determinadas se da la senescencia y muerte, tal es el caso de las hojas, las flores y los frutos (Salisbury, 1992). El crecimiento determinado de raíz ha sido descrito en algunas pteridofitas como *Azolla* y *Equisetum* (Gunning *et al*, 1978), también en *Zea mays* (Varney y McCully, 1991), en *Opuntia arenaria* (Boke, 1979), en *S. gummosus* (Dubrovsky, 1997a) y en conjuntos de raíces de plantas de la familia Proteaceae (Skene, 1996) y otras familias (Dinkelaker *et al*, 1995). Sin embargo existen pocos estudios sobre el análisis de este patrón de crecimiento.

El crecimiento determinado de la raíz primaria puede ser visto como una decapitación fisiológica de la punta de la raíz, que detiene la señal inhibidora de la producción de primordios de raíces laterales. El estudio del meristemo determinado y su funcionalidad puede ser útil para la comprensión del meristemo apical, la organización y mantenimiento de su integridad en angiospermas y para mejorar el entendimiento de los mecanismos de adaptación de las plantas desérticas a su ambiente natural (Dubrovsky, 1997b).

Proliferación y ciclo celular.

Se ha observado que la producción de nuevas células que contribuyen al crecimiento de las plantas, es confinada a las zonas meristemáticas (Webster y McLeold, 1996). La proliferación celular (multiplicación celular) es un proceso esencial del crecimiento de las plantas. Las células con

potencial para dividirse son consideradas como células proliferativas y su multiplicación es el resultado de la división celular. El ciclo celular es un complejo de procesos metabólicos y estructurales que están involucrados en la realización de la división celular. La duración del ciclo está dividido en cuatro periodos: mitosis, en la que ocurre la división celular; G_1 , que es un periodo de preparación metabólica para la fase S o síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y finaliza con otro periodo llamado G_2 , en el cual ocurren procesos sintéticos y estructurales necesarios para soportar la siguiente fase mitótica (Salisbury, 1992).

La duración del ciclo celular puede variar por la dimensión de cada una de sus fases. En las células meristemáticas de la raíz de varias especies la duración de S está determinada por los cambios en la cantidad de ADN nuclear. La división y la diferenciación celular, por otro lado, son controlados por factores que operan durante G_1 y G_2 (Van't Hof, 1985). La productividad celular está cercanamente relacionada al crecimiento. La velocidad de crecimiento de las plantas es un factor que puede ser utilizado para evaluar sus máximos potenciales. Se ha observado que la productividad de algunas Cactáceas cultivadas puede ser tan alta como la de plantas empleadas en cultivos agrícolas comerciales (Nobel, 1988). La velocidad de crecimiento de la raíz (V) ha sido estimada en *Pachycereus pringlei*, *Ferocactus peninsulæ* y *Stenocereus gummosus* siendo de 178.1, 111 y 92.8 $\mu\text{m/h}$ respectivamente. Al utilizarse este parámetro para estimar la duración del ciclo celular (T) se ha observado que T es similar al de especies agrícolas comerciales como *Cucúrbita pepo*, *Zea mays*, *Pisum sativum* y *Triticum aestivum* (Dubrovsky, et al, 1998).

En el meristemo de la raíz con crecimiento determinado de *S. gummosus* se dedujo que ocurren de 2 a 5 ciclos celulares durante el desarrollo de este órgano (Dubrovsky, 1997b; Dubrovsky et al 1998), el número de ciclos celulares (n) puede ser considerado como un posible factor interno permitiendo o limitando el crecimiento. Ante esto, surgen algunas interrogantes como: a) ¿ n es

limitado como resultado de la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales en donde viven o está determinado genéticamente?, b) ¿el número máximo de ciclos celulares en el meristemo para completar el crecimiento de la raíz se conserva en las poblaciones o no? y cuál es su variación en el caso contrario, c) ¿Existen factores externos que puedan afectar este patrón de crecimiento?. Se han realizado trabajos para resolver estas interrogantes, pero aún falta información al respecto para entender estos procesos.

Factores externos que pueden afectar el patrón de crecimiento

Varios factores pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas externa-e internamente como es el caso del pH del suelo, la temperatura, la concentración de sales minerales y fitoreguladores, entre otros.

En plantas se ha demostrado que cambios en la temperatura (incremento o decremento) pueden afectar negativamente la duración de la mitosis y el ciclo celular y pueden cambiar la organización del meristemo de la raíz primaria de las plantas. Esto fue observado en *Pisum sativum* en donde la velocidad de crecimiento decrece cuando la temperatura se eleva (de 25° a 32° C), y este efecto se revierte si se regresa a su punto inicial (Gladish y Rost, 1993). Es interesante responder a la pregunta: ¿cambia o no el patrón y duración de crecimiento y el número de ciclos celulares? y si cambia ¿cómo lo hace en la raíz con crecimiento determinado cuando ésta es sometida a temperaturas óptimas y subóptimas?.

Otro factor importante es el potencial de iones de hidrógeno que puede ejercer una gran influencia en el crecimiento de las plantas endógenamente y exógenamente. El pH ácido es conocido

como promotor y el básico predominantemente como inhibidor de la elongación de la raíz de algunas especies (Edwards y Scott, 1974). El pH ácido en la tierra puede afectar indirectamente el crecimiento de la planta limitando la obtención de algunos compuestos importantes como el molibdeno, fósforo, calcio o magnesio y puede también, inhibir directamente el crecimiento de las plantas (Yan *et al*, 1992). Un efecto causado por pH básico observado en *Lupinus angustifolius* es la disminución de la elongación y la expansión celular en la epidermis y el córtex externo, dando como resultado la malformación de las células epidérmicas y consecuentemente, la reducción del desarrollo de pelos radicales lo que disminuye la superficie de absorción y aumenta la susceptibilidad ante el ataque por patógenos (Tang *et al*, 1993). Tomando en cuenta los efectos conocidos del pH sobre el crecimiento es importante estudiar su acción sobre la proliferación celular de la raíz con limitaciones de crecimiento determinado.

El metabolismo de la planta puede también ser afectado por las fitohormonas y la obtención de nutrimentos, ambos están co-involucrados en el crecimiento de la raíz primaria y también en el desarrollo de raíces laterales (Bertell y Eliasson, 1992). Los fitoreguladores son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y trasladados a otra parte, donde en muy bajas concentraciones causan una respuesta fisiológica (Salisbury, 1992). Se conocen diferentes grupos de fitoreguladores entre los que se encuentran las auxinas, giberelinas y citoquininas entre otros. Las auxinas son sintetizadas en el tallo y transportadas a la punta de la raíz (Martin y Elliot, 1984), donde pueden acumularse (Hasenstein y Evans, 1986). El ácido indolacético (IAA) es la auxina más comúnmente encontrada en las semillas y ápices de tallos. El efecto de esta auxina puede ser inhibidor o promotor del crecimiento de los órganos de las plantas dependiendo de sus concentraciones (Pilet *et al*, 1979); las raíces son muy sensibles al IAA ya que en concentraciones menores a 10^{-8} M las células de la raíz inician la extensión celular; los sitios receptores del IAA son las células rizodermiales

de la zona apical de la raíz (Radermacher y Klämbt, 1993). Las citoquininas son sintetizadas en hojas y en las puntas de raíces y transportadas al torrente del tallo, son compuestos derivados de adenina y promueven la división celular (Salisbury, 1992). Estos compuestos no parecen estar involucrados en la regulación de la elongación de la raíz aunque, por otro lado, existe evidencia de que las citoquininas interactúan con las auxinas en la promoción de la proliferación celular y en la regulación de la formación de raíces laterales (Bertell y Eliasson, 1992). Finalmente con base en los efectos observados de las auxinas y citoquininas en la división celular es necesario verificar si estas hormonas pueden cambiar el patrón de crecimiento de una raíz determinada o afectar el número de ciclos celulares en el meristemo.

Este trabajo considera algunos aspectos importantes de la organización del crecimiento determinado en la raíz primaria de *Stenocereus gummosus* y particularmente el análisis de la proliferación celular. El estudio del crecimiento de la raíz primaria en diferentes condiciones experimentales es importante para examinar el comportamiento de la proliferación celular en el meristemo apical, así como determinar si existen limitaciones internas de crecimiento de la raíz de la planta. El estudio del meristemo determinado y su funcionalidad puede ser útil para la comprensión del meristemo apical, la organización y mantenimiento de su integridad en angiospermas y para mejorar el entendimiento de los mecanismos de adaptación de las plantas desérticas a su ambiente natural (Dubrovsky 1997b).

1.1. DESCRIPCIÓN DE *Stenocereus gumosus* (Engelm.) Gibson y Horak.

Esta planta es conocida también como *Machaerocereus gummosus* (Engelmann) Britton et Rose de la familia Cactaceae así como su nombre común pitaya agria.

Se caracteriza por constituir arbustos semierectos que forman matorrales como de 10 m de diámetro o más, de 1 a 3 m de alto, ramificados desde abajo con ramificación abierta, los tallos se inclinan generalmente del mismo lado o son semipostrados. *Ramas* de 5 a 8 cm de diámetro, color verde oscuro. Generalmente presentan 8 *Costillas*, rara vez 7, *Areolas* más bien grandes, distantes entre sí como 2 cm, *espinas* gruesas, aproximadamente de 8 a 15 mm de largo gruesas y fuertemente aplanadas, *flores* 1 en cada aréola, nocturnas, de 10 a 15 cm de largo; pericarpelo con podarios próximos y escamas triangulares pequeñas que llevan en las axilas fieltro y espinas pequeñas; *fruto* ovoide hasta globoso, de 6 a 8 cm de diámetro, escarlata, espinoso, las *areolas* caen cuando el fruto madura; pulpa purpúrea de sabor agradable y algo ácida; conserva adheridos los restos secos del perianto. *Semillas* como de 2.5 mm de largo, finamente tuberculadas.

Se distribuye ampliamente por la península de Baja California e islas adyacentes, en donde forma densos matorrales, crece en todas partes de la península y en toda clase de terreno, los tallos contienen saponinas o triterpenos venenosos, por lo que los pescadores los usan machacados para envenenar el agua. De esta especie se han aislado los triterpenos llamados ácido machaérico y gummosogenina (Bravo-Hollis, 1978). El fruto es comestible y los españoles le atribuían la propiedad de curar el escorbuto (León de la Luz y Domínguez-Cadena, 1991). También el jugo se usa como vino (Gibson y Nobel, 1986).

Las investigaciones sobre el género *Stenocereus* se han enfocado a determinar sus características biológicas, como porcentaje de germinación y producción de flores y frutos entre

otras, así como optimizar los métodos para su cultivo y posterior comercialización (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; León de la Luz *et al*, 1995), y sobre la fisiología de sus raíces (Dubrovsky 1996, 1997a, 1997b y 1998).

Figura 2.- *Stenocereus gummosus*

otras, así como optimizar los métodos para su cultivo y posterior comercialización (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; León de la Luz *et al*, 1995), y sobre la fisiología de sus raíces (Dubrovsky 1996, 1997a, 1997b y 1998).



Figura 2.- *Stenocereus gummosus*

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE RECOLECCIÓN DE SEMILLAS

La Paz se localiza en la costa occidental del Golfo de California entre los 20° 01'- 24°06' Norte y 110° 22'- 110° 25' Oeste (INEGI 1995). El clima es muy seco, cálido y extremo con precipitación invernal superior al 10 % del total anual Bw (h) hw (e) (García, 1973). La precipitación se distribuye en dos periodos, el más importante ocurre en el verano y se encuentra frecuentemente influenciado por la presencia de huracanes, y el otro ocurre en invierno. La distribución de lluvias provoca una marcada estacionalidad con una época de sequía de hasta 5 meses (Abril a Julio) (Maya 1995). La precipitación total y la temperatura media anual para un intervalo de 69 años en la Paz fueron de 179.2 mm y 23.4 °C (Comisión nacional del agua, comunicación personal).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la actividad proliferativa y evaluar si existen limitaciones internas en el desarrollo del meristemo apical de la raíz primaria de *Stenocereus gummosus*.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

2.1. Diseñar un método de estimación de la proliferación celular del meristemo apical de la raíz primaria de *Stenocereus gummosus*, basado en el análisis de producción celular.

2.1.1. Estimar la longitud y el número de células generadas por la actividad del meristemo apical de raíz al final de su crecimiento determinado.

2.1.2. Estimar el número de ciclos celulares en el meristemo apical de la raíz de *S. gummosus*.

2.2. Estimar la distribución del número máximo de ciclos celulares en la raíz primaria de una población de plantas germinadas, cuando la raíz termina su desarrollo.

2.3. Determinar si algunos factores externos como el pH en el medio de cultivo, la temperatura, precursores metabólicos y fitoreguladores exógenos pueden cambiar el patrón de crecimiento y afectar el número máximo de ciclos celulares en el meristemo apical de la raíz primaria de *S. gummosus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las semillas.

Se colectaron previamente 50 frutos maduros de *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson y Horak en los alrededores de la ciudad de La Paz durante el mes de Septiembre de 1995 que es el mes en el que se encuentra una mayor cantidad de frutos, se consideró como frutos maduros a aquellos que tenían la totalidad de la cáscara y la pulpa de color escarlata, éstos se despulparon para obtener las semillas (cada fruto cuenta con alrededor de 1200 semillas \pm 200), las cuales fueron colocadas en un recipiente con agua para elegir aquellas con mayor densidad; después de un día de secado a temperatura ambiente se almacenaron en pequeñas bolsas de papel, estas a su vez se introdujeron en bolsas de aluminio, conteniendo sílica gel y se guardaron en el refrigerador a una temperatura de 10° C, para conservar sus características de germinación (G, Hendry y J, .Grime 1993).

3.2. Germinación de las semillas en papel filtro.

Las semillas se limpiaron, colocándose durante cinco minutos en 40 ml de solución de hipoclorito de sodio al 5 % (cloro de uso casero cloralex) y 40 μ l del detergente tritón X-100 al 10 %, después de lo cual se enjuagaron cuatro veces con agua destilada. Se colocaron 3 cajas Petri, cada una con 100 semillas por caja (14 cm de diámetro) inclinadas (18° a 20° al horizonte) para evitar la inundación de las semillas, con papel filtro como soporte (Whatman No. 1) a las cuales se adicionaron 20 ml de solución mineral de Hoagland al 10 %, manteniéndose en un fotoperiodo de 12

h. día/noche a una temperatura de 28° a 30° C y humedad relativa entre 65 y 75 % en un cuarto de ambiente controlado (Dubrovsky, 1996).

3.3. Germinación de las semillas en agar.

Las plántulas utilizadas para el diseño del método de estimación de la proliferación celular, y la distribución del número de ciclos celulares en una población de plantas germinadas fueron germinadas en una solución líquida con papel filtro como soporte, sin embargo las fibras de papel filtro se pegaron a las raíces lo cual dificultó su observación, por lo que posteriormente se realizó el sembrado en agar. Para germinar las semillas en agar, todo el material de vidrio, agua y medio de cultivo (solución de Hoagland al 20 %, sacarosa al 2 % y agar al 0.8 % Sigma chemicals) fue esterilizado en autoclave a 125 libras de presión por 1 h, las semillas se lavaron con cloro y tritón como en el procedimiento antes descrito utilizándose adicionalmente un agitador magnético, después de ser enjuagadas tres veces con agua se sumergieron en alcohol al 70 % por 20 segundos, seguidos de otros tres lavados en agua destilada, se sembraron en agar y se mantuvieron en un cuarto de ambiente controlado, con un fotoperiodo de 12 h día/noche a una temperatura de 28° a 30° C y humedad relativa entre 65 y 75%, el procedimiento se realizó en tres cajas, en las que se distribuyeron aleatoriamente 300 semillas, de estas cajas se tomaron las plántulas que al cuarto día del inicio de la germinación tenían una radícula mayor de 0.5 mm y menor de 1mm, para ser trasladadas a las cajas de Petri con las características a analizar en donde continuaron su crecimiento.

3.4. Modelo para la estimación de la proliferación celular (MEPC).

El método de estimación de la proliferación celular (MEPC) se basa en un modelo de crecimiento estacionario en la raíz primaria y el método de velocidad de producción celular (VPC), que considera que el número de células en el meristemo apical se incrementa de manera exponencial, aunque el meristemo mantenga, en un momento dado, un número constante de células, y que el número de células producidas en el meristemo durante un ciclo celular es igual al número de células desplazadas a la zona de elongación y es igual a $\ln 2 N_m$ células (Ivanov y Dubrovsky, 1997). El número de ciclos celulares fue estimado en las células epidérmicas de la raíz primaria.

Se aplicaron diferentes métodos para evaluar los siguientes parámetros:

- a) El número de células totales en una fila en tiempo inicial (t_0), considerándose como 12 h después del surgimiento de la radícula (DSR), tomando como hora cero el momento en que las semillas previamente puestas a germinar presentaban la testa quebrada; en este periodo todavía no hay proliferación celular (Dubrovsky 1997b).
- b) El número de células meristemáticas en una fila (N_m).
- c) El número de células totales al tiempo final (t_f) considerándose a t_f como 10 días DSR.

El método empleado para cada parámetro se explica a continuación.

3.4.1. Método para cuantificar el número de células totales en una fila en tiempo inicial (N_{t_0}).

En el cuarto día del inicio de la germinación (en papel filtro y solución mineral), se seleccionaron aquellas plántulas con 12 h DSR (considerándose como el inicio de la salida de la radícula a aquellas semillas que presentaban la testa quebrada) y con una longitud de raíz entre 500 y 700 μm . Las raíces se cortaron longitudinalmente utilizando un microscopio estereoscópico y una navaja de afeitar. Se fijaron con alcohol al 70 % por 30 segundos y se lavaron con agua destilada,

aplicándose posteriormente 1 ml de propidio ioduro al 0.0005 % por 10 segundos, se lavaron nuevamente con agua, y se aplicó 1 ml de Fluorescent Brigtener 28 al 0.001 % (Calcoflorum white, Sigma) durante 10 segundos, seguidos de un lavado con agua destilada, este método de tinción produce una intensa fluorescencia roja de los núcleos y fluorescencia azul en las paredes celulares (Mendoza, 1998). Se observó el material con un microscopio de epifluorescencia con lámpara de mercurio y triple cubo de excitación para DAPI-FITC-TEXAS red, se estimó el número de células en una fila de cada raíz.

3.4.2 Método para cuantificar el número de células meristemáticas en una fila (Nm).

Una vez obtenidas las plántulas al cuarto día del inicio de la germinación (en papel filtro y solución mineral), se seleccionaron aquellas plántulas 12 h DSR cuyas raíces tenían una longitud entre los 700 y 1900 μm y se cortaron transversalmente dejando una pequeña fracción del hipocótilo para poder manipularlas. En ésta etapa de desarrollo la raíz inicia el crecimiento y es posible observar los meristemas después de la tinción. El material fue fijado en una mezcla de alcohol al 70 % y ácido acético glacial en una relación 3:1 por 24 h. Se lavaron 3 veces con alcohol al 70 % (en esta solución el material puede conservarse indefinidamente). La hidratación del material se realizó transfiriéndolo a alcohol 50 % por 5 minutos, después a alcohol 30% por otros 5 minutos, y se lavó 4 veces con agua destilada por 3 minutos. El material fue hidrolizado con HCl 1 N en baño María a 60° C por exactamente 10 minutos (el HCl se calentó previamente ya que los 10 minutos es el tiempo crítico de la reacción). Se sumergió el recipiente con las raíces en agua con hielo por 10 segundos para bloquear la reacción, y se lavó con agua 4 veces para eliminar el ácido, utilizando embudo y papel filtro; las raíces fueron secadas cuidadosamente. La tinción se realizó con el reactivo de Schiff

dejándose por 10 a 60 minutos en oscuridad y temperatura ambiente hasta que se observase una intensa tinción púrpura en la punta de las raíces. El material se enjuagó y retiró el reactivo de Schiff con solución MAC (agua destilada, metabisulfito de potasio al 10 %, y ácido clorhídrico 1 N en relación 20:1:1 respectivamente (Berlyn y Mikshe 1974)) 4 veces durante 5 minutos cada una y se lavó con agua destilada 3 veces por 3 minutos. Las raíces se deshidrataron por 15 minutos en cada una de las siguientes soluciones : alcohol 96 % I, alcohol 96 % II, alcohol absoluto, alcohol-xilol en relación 1:1, xilol I y xilol II. Finalmente, se colocaron las raíces ligeramente impregnadas con xilol en portaobjetos y se montaron en bálsamo de Canadá (Fisher chemicals), cubriéndose cuidadosamente con cubreobjetos, para ser observadas al microscopio óptico (Contreras 1996), considerándose como células meristemáticas a aquellas con 1.- tamaño relativamente pequeño y forma isodiamétrica de la célula, 2.- corta distancia entre los núcleos de células vecinas en una fila (distancia igual o menor al diámetro del núcleo) y 3.- presencia de núcleos que abarcan la mayor parte de la célula. Este método permite distinguir con claridad a las células meristemáticas del resto de tipos celulares.

3.4.3. Método para el conteo del número de células totales en t_f (N_{t_f}).

Como las raíces al final de su desarrollo (10 días DSR) están densamente cubiertas por pelos radicales que dificultan la observación de las células en una fila, se aclaró el material para el conteo celular por medio de la metodología que a continuación se describe (Modificado del método de aclaración de raíces para la observación de micorrizas de Phillips y Hayman, 1970).

Las raíces de plántulas (germinadas en papel filtro y solución mineral) se colocaron en una solución de KOH al 5 % por 30 minutos a 90° C y se lavaron con agua destilada cuatro veces.

Posteriormente se pusieron en HCl al 2.7 % por 30 minutos a temperatura ambiente, y se tñeron con azul de toluidina al 0.05 % realizando infiltración con bomba de vacío hasta alcanzar las 25 libras de presión negativa fomentando así el paso del colorante al interior de los tejidos. Finalmente, el exceso de colorante fue eliminado por absorción con papel filtro y el material fue montado con una solución compuesta con 60 % de glicerol, 37.5 % de agua y 2.5 % de HCl y fueron observadas al microscopio. Este método permitió contar fácilmente el número y la longitud de células epidérmicas en una fila en la parte media de la raíz, debido a que fueron diferenciadas por la tinción azul de sus paredes celulares y los pelos radicales no fueron teñidos.

Tomando en cuenta que hasta un periodo de tiempo las raíces tienen un número de células meristemáticas constante y crecen estacionalmente (Dubrovsky, 1997b), es posible considerar que durante el periodo de un ciclo de división celular el meristemo produce $\ln 2 Nm$ células (Ivanov, 1994; Ivanov y Dubrovsky 1997). El número de ciclos celulares realizados en la raíz durante su crecimiento (n) fue determinado como:

$$n = N_{tf} - N_{t0} / \ln 2 Nm$$

n fue evaluado para la raíz de cada individuo en una población de planta germinadas.

El MEPC puede aplicarse en la raíz primaria de *S. gummosus* ya que crece rápidamente durante el periodo de crecimiento lineal y concluye este crecimiento en corto tiempo (aproximadamente cinco días), la actividad mitótica disminuye rápida y exponencialmente, y la longitud del meristemo es constante durante el periodo de 12 a 36 h DSR (Dubrovsky, 1997b).

Se propone como una forma sencilla de estimación de la proliferación celular porque la metodología empleada consiste en la observación directa de la células, es decir, sin la necesidad de realizar cortes histológicos, ni de usar compuestos radioactivos o inhibidores de la división celular, comúnmente utilizados para el análisis cinético en los meristemas de las raíces como la timidina

tritiada, la colchicina o la cafeína y junto con la medida de otros parámetros podría mejorar la comprensión de los mecanismos de desarrollo de las plantas.

3.5. Efecto de factores externos sobre el patrón de crecimiento de la raíz.

3.5.1 Efecto del pH en el crecimiento de la raíz.

Para estudiar el efecto del pH en las plántulas germinadas en agar con raíz de longitud mayor a 0.5 mm se transfirieron a tres medios compuestos de solución mineral de Hoagland al 20 %, sacarosa al 2 %, amortiguador MES/tris 5 mM y agar al 0.8 % (Hasenstein y Evans 1988), los cuales fueron previamente ajustados para obtener tres pHs: ácido 5.5, neutro 7.0 y básico 8.5. Las cajas petri (una caja con 20 plántulas, y una caja por cada pH) con las plántulas fueron colocadas en posición vertical ya que en esta posición se facilitó el conteo diario de la longitud de las raíces por la transparencia del medio y de la caja Petri, sin afectar su crecimiento (Gerrit y Baskin 1998). Se midieron las raíces diariamente por diez días con papel milimétrico, al final de este periodo de tiempo fueron tratadas con el método para el conteo del número de células totales en t_f , y se midió la longitud de la raíz, la longitud de diez células en la parte media de cada raíz, y el número total de células en una fila para realizar un análisis celular del crecimiento de la raíz.

3.5.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la raíz.

Para observar el efecto de la temperatura se colocaron dos cajas petri en posición vertical con 20 plántulas cada una germinadas en agar y pH 5.5, la primera caja fue mantenida en el cuarto de

ambiente controlado con las características mencionadas para la germinación y la segunda caja con dos regímenes de temperatura, 12 h de luz en el cuarto de ambiente controlado $30 \pm 1^\circ \text{C}$ y 12 h de oscuridad en el refrigerador entre 10 y 11°C , en posición vertical. La longitud de la raíz fue medida cada 24 h por diez días, al final de los cuales las raíces fueron tratadas con el método para el conteo del número de células totales en t_f . La longitud de cada raíz fue medida, así como diez células en la parte media y el número de células en una fila, con los datos obtenidos se realizó un análisis celular del crecimiento de la raíz.

3.5.3. Efecto de los fitoreguladores en el crecimiento de la raíz primaria.

Para observar el efecto de las hormonas se prepararon cuatro medios con solución mineral de Hoagland al 20 %, sacarosa al 2 %, amortiguador MES/tris 5 mM y agar al 0.8 %, y se ajustaron a pH 5.5. Se preparó el primer medio o placa testigo con la composición mencionada, y se adicionaron por filtración las concentraciones previamente diluidas de fitoreguladores al resto de cajas (una caja con 20 plántulas para cada tipo de fitoregulador); a una segunda caja se adicionó Zeatina 10^{-8} M, al tercero Ácido Indolacético 10^{-8} M (su forma sólida fue diluida con una fracción de 0.001 ml de alcohol al 96 %, y posteriormente la dilución total se realizó con agua destilada) y al cuarto Zeatina 10^{-8} M y Ácido Indolacético 10^{-8} M. Al cuarto día del inicio de la germinación se seleccionaron aquellas plántulas previamente puestas a germinar en agar (20 como mínimo para cada caja Petri) con una longitud de raíz mayor a 0.5 mm y menor de 1 mm, y se transfirieron a las cajas Petri con los medios y se mantuvieron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para la germinación. Las cajas Petri fueron colocadas en posición vertical y se midió la longitud de la raíz con papel milimétrico por diez días, y como en los experimentos anteriores las raíces fueron tratadas a los diez

días DSR con el método para el conteo del número de células totales en t_f y se tomó medida de la longitud de la raíz, la longitud de diez células en la parte media de la raíz y el número de células en una fila.

A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis celular, todas las gráficas (excepto las de distribución de frecuencias) y las pruebas t-student fueron hechas con el paquete Sigma plot para Windows ver. 3, las regresiones lineales fueron hechas con Excel para Windows ver. 6.0, las gráficas de distribución de frecuencias y los análisis de varianza (ANOVA) (los cuales fueron realizados en el análisis de pH y Hormonas por tener mas de dos condiciones distintas Zar 1984) fueron realizados en Statistica para Windows ver. 5.0.

El análisis de las gráficas de crecimiento obtenidas se basó en las características de las curvas de crecimiento mencionadas por Taiz 1991, quien dice que al ser medido periódicamente el crecimiento de la planta, en la gráfica construida con los datos obtenidos en función del tiempo se obtiene frecuentemente una curva parecida a una S, esta curva muestra al inicio un periodo de bajo crecimiento (fase lag), la cual es seguida por un periodo de rápido crecimiento (fase logarítmica y exponencial), las cuales en turno son sucedidas por otro periodo en el cual el crecimiento es lento o ausente (fase estacionaria). El tipo de curva S puede ser aplicada en células, órganos de planta y en cualquier planta. Una multitud de factores afectan la velocidad de crecimiento de las plantas y presentan variaciones en este tipo de cinética de crecimiento.

Todos los compuestos utilizados fueron de Sigma Chemicals.

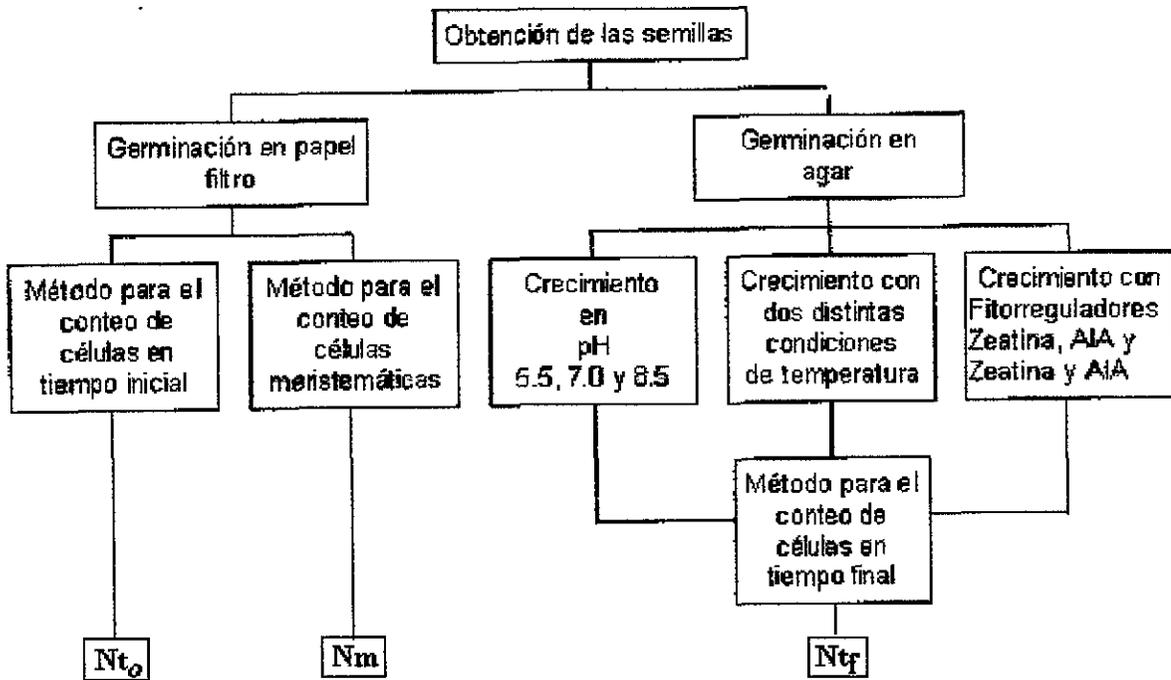


Figura 3.- Resumen del método utilizado para cada caso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1. Método de estimación de la proliferación celular.

La estimación del número de ciclos celulares transcurridos en las células epidérmicas en una fila de la raíz primaria se basó en la productividad de células en la raíz. Los resultados obtenidos al evaluar la productividad fueron los siguientes:

Se analizaron 16 raíces para determinar el número total de células en una fila en tiempo inicial (Nt_0), obteniéndose 41.6 ± 1.5 E.E. células en promedio en una fila de células y una longitud promedio de raíz de 565.6 ± 3 μm . Los datos para cada variable fluctúan de 30 a 50 células y de 430 a 690 μm respectivamente. No se detectó ninguna relación entre la longitud de la raíz y el número total de células, ya que raíces largas no necesariamente presentan un mayor número de células que raíces cortas.

Para determinar el número de células meristemáticas (Nm) se analizaron 16 raíces, obteniéndose en promedio 12.3 ± 1.1 células meristemáticas y una longitud promedio de la raíz de 1213 ± 67.3 μm .

Los promedios obtenidos del conteo de células totales Nt_0 y el número de células meristemáticas Nm son relativamente pequeños y similares al de otras Cactáceas como *Stenocereus thurberi* y *Ferocactus peninsulæ*, esta última presentó en promedio 23 células meristemáticas (Dubrovsky, 1997b), así como el de algunas pteridofitas como *Azolla* (Gunning, 1978) y *Equisetum* (Gifford y Kurth, 1982 y Gifford 1993) las cuales poseen una sola célula inicial y también un patrón de crecimiento determinado. Con base en lo anterior, se considera que el crecimiento determinado de la raíz primaria podría estar relacionado con la organización del meristemo apical, ya que las raíces que tienen este tipo de crecimiento presentan también un reducido número de células meristemáticas.

Hipotéticamente, un periodo limitado de actividad meristemática durante el crecimiento determinado podría ser causado por un agotamiento temprano (o ausencia) del centro quiescente, o de las células iniciales, por lo tanto, un pequeño número de células iniciales en *S. gummosus* podría explicar la rápida pérdida de la integridad del meristemo (Dubrovsky, 1997a).

Los datos obtenidos del conteo del número de células totales en t_f (N_{t_f}) diez días DSR en 80 raíces fueron los siguientes: la raíz presentó 55 ± 6.15 células en una fila, una longitud promedio de $5987 \pm 670 \mu\text{m}$ y $139 \pm 15.53 \mu\text{m}$ en la longitud promedio de diez células en la parte media de la raíz.

Los datos promedio de todos los parámetros antes mencionados se aplicaron a la fórmula propuesta.

N_{t_0} = número total de células en una fila de la epidermis en tiempo t_0 = 41.6 células

N_m = número de células meristemáticas en tiempo t_0 = 12.3 células

y en el caso de N_{t_f} = número total de células en una fila de la epidermis en tiempo t_f = 55 células, se sustituyó N_{t_f} por el valor obtenido en cada raíz.

El número de células promedio producidas (N) fue de:

$$N = N_{t_f} - N_{t_0}$$

$$N = 55.1 - 41.6 = 13.5 \text{ células}$$

El número de ciclos celulares promedio transcurridos (n) se estimó con la siguiente fórmula:

$$n = (N_{t_f} - N_{t_0}) / \ln 2 N_m t_0$$

$$n = 55.1 - 41.6 / \ln 2 (12.3) = 1.6$$

El corto número promedio de ciclos celulares transcurridos de 1.6 ± 0.17 ciclos celulares, aunados a una corta duración del periodo de crecimiento de la raíz (aproximadamente cuatro días), muestran el escaso gasto energético que realiza la planta para el desarrollo de la raíz primaria. En *S.*

gummosus, después de la corta duración del periodo de actividad del meristemo apical de la raíz primaria, se activa la iniciación de primordios de raíces laterales y el periodo entre la iniciación de primordios de raíces laterales y el surgimiento de estas es muy rápido, al encontrarse en un intervalo entre 60 a 72 h (Dubrovsky, 1997b), el cual es similar al de plantas de interés comercial como *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris* (Thompson y MacLeold, 1981) y más corto al de *Pisum sativum* (Thompson y MacLeold, 1981) y *Vicia faba* (MacLeold, 1976). Probablemente el rápido establecimiento de plántulas depende de estos dos eventos: corta duración del periodo de actividad del meristemo apical y rápido desarrollo de raíces laterales, considerando además, que la germinación de las semillas en los ambientes áridos está usualmente asociada a cortos periodos de disponibilidad de agua (Dubrovsky, 1997a).

4.1.1. Estimación de la longitud y el número de células generadas por la actividad del meristemo apical de la raíz.

Los datos obtenidos en el conteo de células totales en tiempo t_f fueron utilizados junto con la longitud de cada raíz para hacer una estimación de la longitud y el número de células generadas por la actividad del meristemo apical (Figs. 4 y 5).

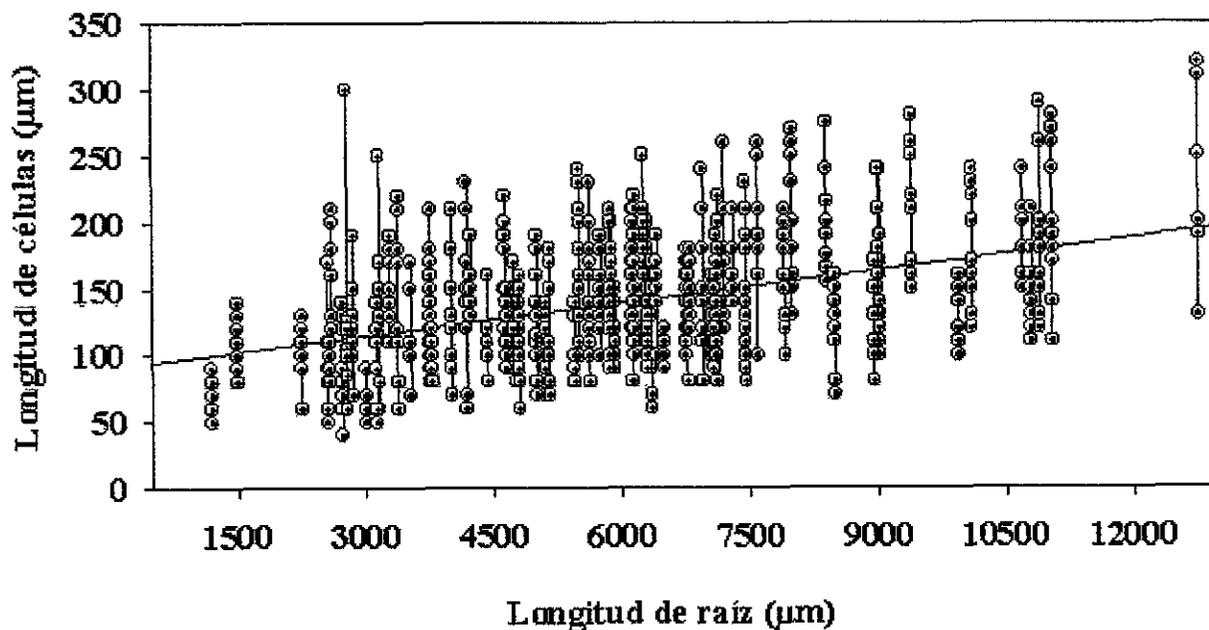


Figura 4.- Longitud de la raíz primaria vs longitud de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria al tiempo final (t_f), en una población de *S. gummosus* al final del crecimiento determinado. Modelo: $y = 0.0082x + 89.90$, ($r^2 = 0.37$, No. de raíces = 80).

El intervalo de la longitud de las células en una fila de la raíz fue desde 40 μm hasta 320 μm y el promedio fue de $139 \pm 30.11 \mu\text{m}$. Se observó que, al incrementarse la longitud de la raíz también se incrementó la longitud de las células. Para observar si existía una relación entre las dos variables se aplicó la prueba estadística de correlación. El resultado mostró que dicha relación es estadísticamente significativa al encontrarse un $P < 0.05$, el valor de la r^2 de la Fig. 4 muestra que los datos se encuentran dispersos. Sin embargo la distribución general indica que células relativamente cortas (50 a 70 μm) y células largas (250 a 300 μm) estuvieron presentes en raíces de cualquier tamaño.

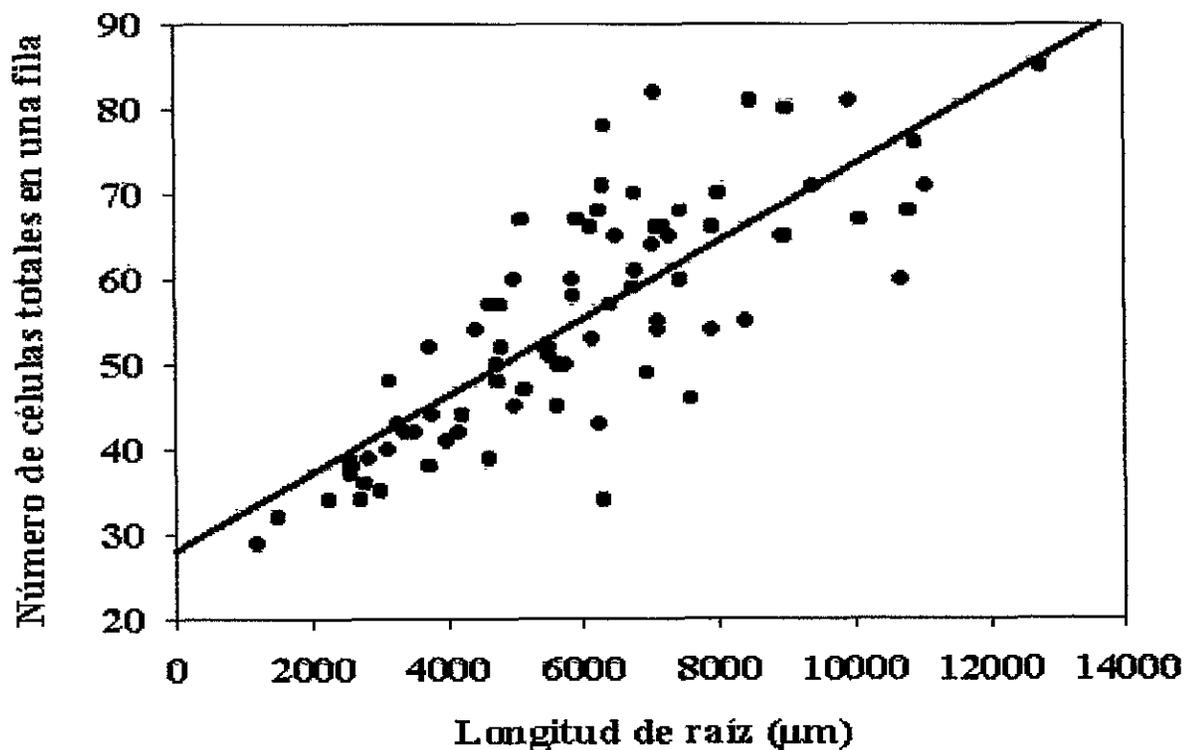


Figura 5.- Longitud de la raíz primaria vs número de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria en tiempo final (t_f) en una población de *S. gummosus* al final del crecimiento determinado. Regresión lineal de primer orden: $y = 0.0046x + 27.70$, ($r^2 = 0.64$, No. de raíces = 80).

El número promedio de células totales en una fila de la raíz fue de 59 ± 6.15 células y éste se incrementó junto con la longitud de la raíz.

La correlación entre el número de células y la longitud de la raíz fue significativa ($r^2 = 0.64$, $P < 0.05$) (Fig. 5), lo que implica que la varianza explicada por el modelo es mayor que en el caso de la Fig. 4 la cual obtuvo un valor de $r^2 = 0.37$ la cual no es significativa.

4.1.2. Estimación del número de ciclos celulares transcurridos en el meristemo apical de la raíz primaria de una población de plantas germinadas al finalizar su crecimiento.

Para estimar el número de ciclos celulares transcurridos en el meristemo apical de la raíz primaria de una población, se tomaron; el promedio de células totales en tiempo inicial t_0 , el número promedio de células meristemáticas (n_m) y el número de células totales en tiempo final t_f de cada una de las 80 raíces de la población, estos valores sustituyeron a las variables N_{t_0} , N_m , y N_{t_f} respectivamente en la fórmula propuesta; número de ciclos celulares (n) = $(N_{t_f} - N_{t_0}) / \ln 2 N_m$.

Los promedios obtenidos de las 80 raíces fueron de 5987 μm en la longitud de la raíz y 1.58 ciclos celulares transcurridos hasta el final del crecimiento de las raíces. A continuación se presenta una gráfica que muestra la relación entre la longitud de la raíz y el número de ciclos celulares (Fig. 6).

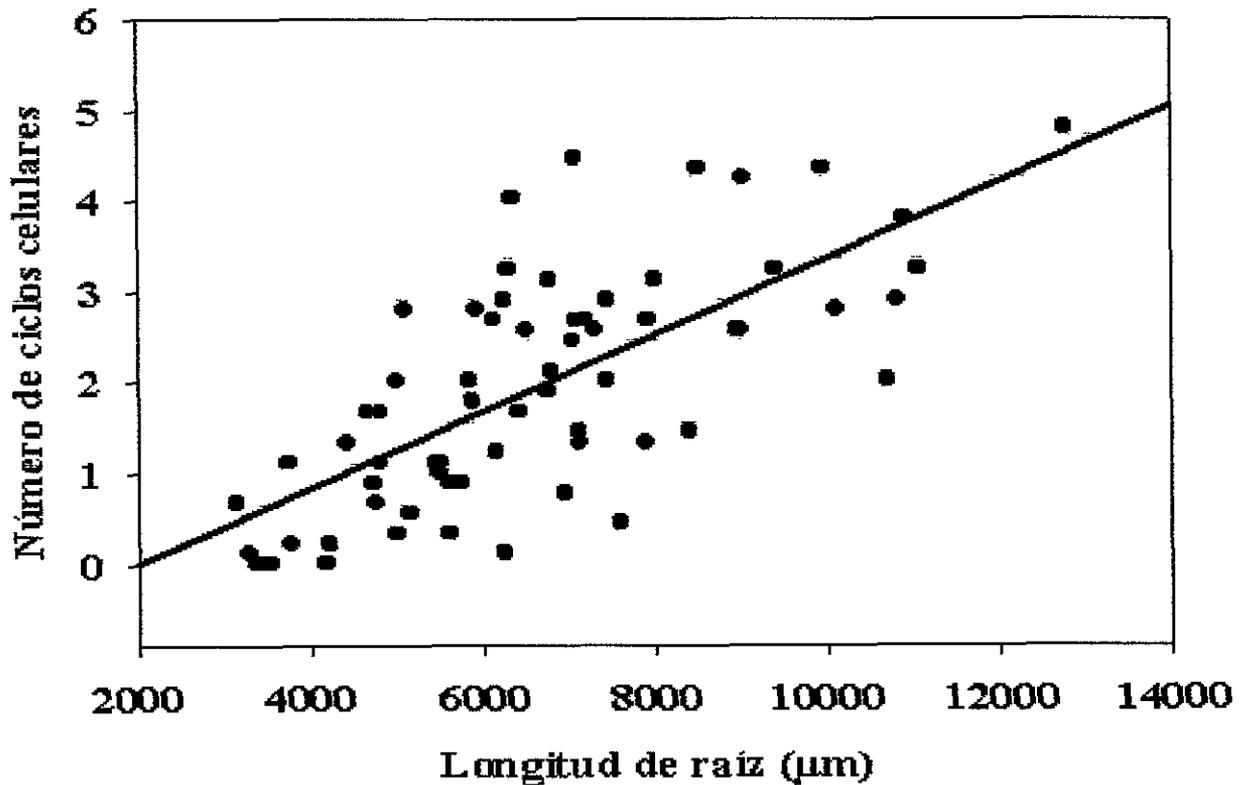


Figura 6.- Longitud de la raíz primaria en una población de plantas germinadas vs número de ciclos celulares ocurridos en el meristemo apical de la raíz primaria al finalizar su crecimiento. Regresión lineal de primer orden: $y = 0.0005x - 1.65$, ($r^2 = 0.64$, No. de raíces = 65).

Con base en los resultados del coeficiente de correlación de la muestra obtenidos en el análisis celular, Figs. 4, 5 y 6, se observó que la ecuación de la recta que explica mejor la asociación de los datos es la obtenida en el número de células y el número de ciclos celulares (Fig. 5 y 6 respectivamente), y la estimación de la proliferación celular podría estar basada preferencialmente en la medida y estimación de estos dos parámetros.

4.2.1. Estimación de la distribución del número de ciclos celulares en la raíz primaria de una población de plantas germinadas.

Para determinar en qué categorías se agrupaban el número de ciclos celulares en la raíz primaria de una población de plantas germinadas, se realizó un histograma de frecuencias el cual se presenta en la Fig. 7.

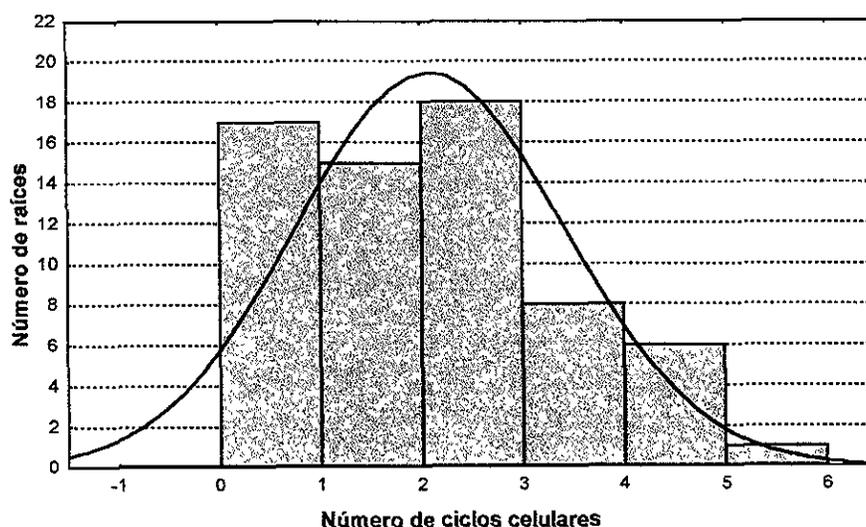


Figura 7.- Distribución del número de ciclos celulares ocurridos en la raíz primaria de una población de plantas germinadas de *S. gummosus*. No. de raíces = 65

La distribución de clases del número de ciclos celulares se comparó con una distribución normal, y al no encontrarse diferencias significativas entre éstas dos se consideró a la distribución obtenida como una distribución normal (Fig. 7). El número de raíces a cada categoría del número de ciclos celulares fue: 17 raíces en la clase de 0 a 1 ciclos celulares, 15 raíces en la clase de 1 a 2 ciclos celulares, 18 raíces en la clase de 2 a 3 ciclos celulares, 8 raíces en la clase de 3 a 4 ciclos celulares, 6 raíces en la clase de 4 a 5 ciclos celulares y 1 raíz en la clase de 5 a 6 ciclos celulares, por lo que la categoría en la que se asoció un mayor número de raíces (o moda) fue en el intervalo de 2 a 3 ciclos celulares al presentarse en 18 raíces, lo cual es el 27.7 % del total de la muestra, y es aquí en donde se encontró también el promedio o media aritmética.

El análisis de la distribución del número de ciclos celulares se realizó individualmente en cada raíz pero se consideró también el valor del número de ciclos celulares en conjunto para toda la población y la variación en ésta permitió conocer las características a nivel de especie. La distribución del número de ciclos celulares en la población de raíces analizada, fue normal (Fig. 7), lo cual muestra que, aunque existen variaciones en el número de ciclos celulares en una población, el número de éstos es reducido y no se incrementa de manera importante; la rápida conclusión de la actividad meristemática, cinco días en todos los individuos analizados, muestra que el patrón de crecimiento determinado es conservado en todas las plántulas de la población estudiada.

4.3.0. Efecto de factores externos sobre el número de ciclos celulares ocurridos en el meristemo de la raíz primaria.

4.3.1 Efecto del pH en el crecimiento de la raíz primaria.

Efecto del pH en el crecimiento de la raíz primaria

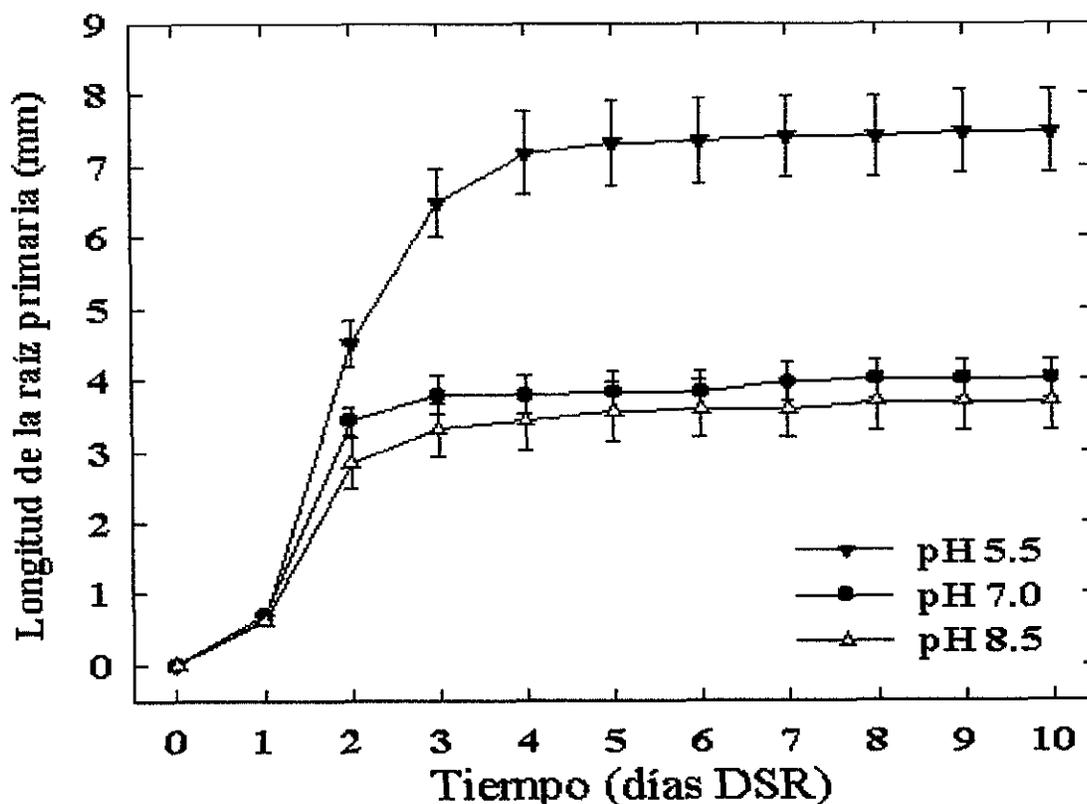


Figura 8.- Crecimiento de la raíz primaria de *S. gummosus* después del surgimiento de la radícula (DSR), en tres regímenes de pH: 5.5, 7.0 y 8.5. Promedio \pm error estándar. No. de raíces = 20 para cada tratamiento.

En todos los tratamientos se observó crecimiento exponencial de las raíces primarias de *S. gummosus* en agar hasta el cuarto día DSR, en el quinto día la curva de crecimiento se hizo asintótica y concluyó con la suspensión del crecimiento (Fig. 8). Desde el segundo día se observaron diferencias entre los tres tratamientos.

Se obtuvo al final del experimento un incremento significativo en el tamaño de las raíces con el tratamiento de pH 5.5, con respecto a los de pH 7.0 y 8.5 ($P < 0.05$) ya que la longitud de la raíz fue de 7.36 ± 0.56 mm en promedio contra 4.0 ± 0.28 mm en pH 7.0 y 3.69 ± 0.39 mm en pH 8.5. Entre estos dos últimos no hubo diferencia significativa, por lo que con base a lo observado se consideró al medio ácido como el óptimo para el crecimiento de las raíces y el pH de este medio fue el que se utilizó posteriormente en la preparación de los medios de cultivo de todos los demás experimentos, considerándose la composición y pH de este medio como el control. Para comparar diferencias entre los distintos tratamiento se realizó un análisis de varianza múltiple (Tabla 1).

Tabla 1.- Resumen del análisis de varianza para observar el efecto del pH en la longitud de raíz . Niveles de significancia * = $p < 0.001$.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
pH	149589584	2	74794792	25.34
Error	153443992	52	2950846	-
Total	303033576	54	77745638	-

Se encontraron diferencias significativas entre el pH 5.5 y los otros dos pH de 7.0 y 8.5, no existiendo diferencia significativa entre estos dos .

Los datos de los regímenes control obtenidos en todos los experimentos al final del crecimiento fueron unificados para el análisis celular, ya que por daño mecánico al tratarse las raíces con el método para conteo de células totales, en algunas raíces no fue posible contar el número y la longitud de las células. Se presenta a continuación la gráfica que muestra la relación entre la longitud de la raíz y el número promedio de diez células en la parte media de la raíz (Fig. 9).

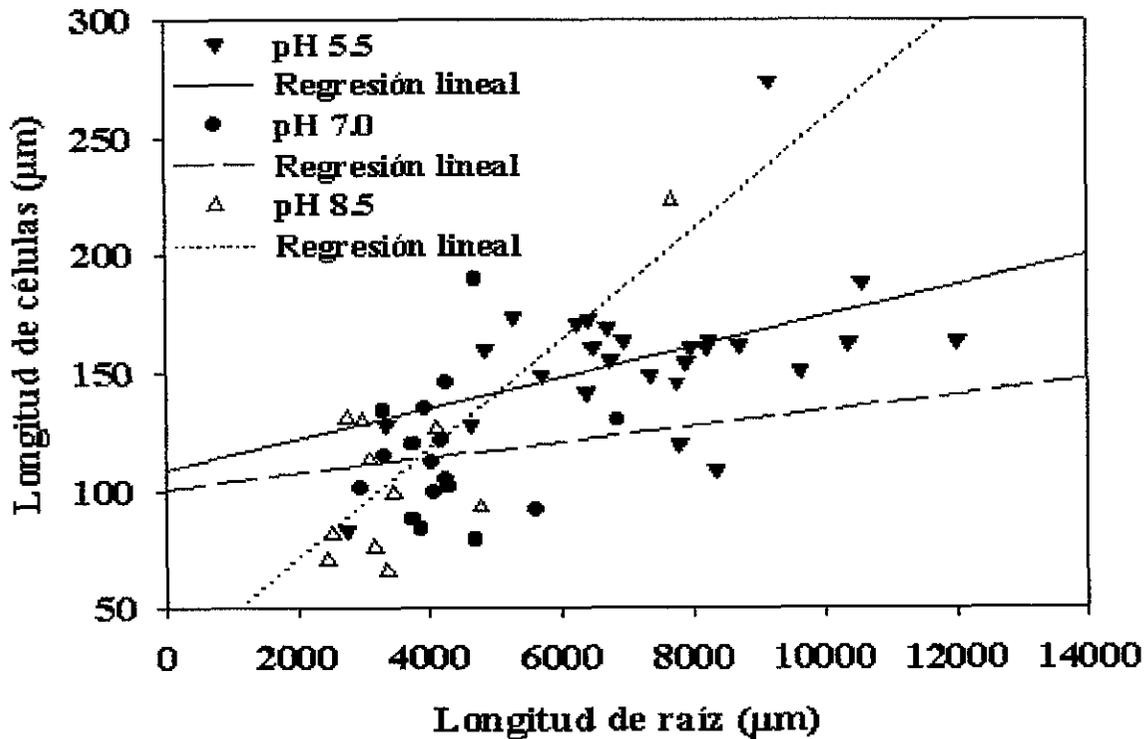


Figura 9.- Longitud de la raíz primaria vs longitud promedio de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria de *S. gummosus*, en tres regímenes de pH: 5.5, 7.0 y 8.5. Regresión lineal de primer orden: pH 5.5 y = $0.0066x + 108.50$, ($r^2 = 0.19$, No. = 27); pH 7.0 y = $0.0033x + 100.69$, ($r^2 = 0.01$, No. = 17); pH 8.5 y = $0.0233x + 24.52$, ($r^2 = 0.61$, No. = 11).

Los datos obtenidos muestran que la longitud promedio de las células en la parte media de todas las raíces se encontraron en su mayoría en un intervalo de 60 a 200 μm , y la longitud de las raíces se incrementó en relación al incremento en la longitud de las células en los tres pHs. A continuación se muestran los resultados del análisis de varianza ANOVA aplicado para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes pHs (Tabla 2).

Tabla 2.- Resumen del análisis de varianza para el efecto del pH en la longitud de las células. Niveles de significancia * = $p < 0.001$.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
pH	26685.7	2	13342.85	12.02
Error	58799.26	53	1109.42	-
Total	61484.96	55	14452.27	-

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la longitud de las raíces mantenidas en pH 5.5 al compararla con la de los otros dos regímenes alcanzando, en promedio, una longitud celular de $156 \pm 30 \mu\text{m}$ contra $114 \pm 27 \mu\text{m}$ en las raíces tratadas con pH 7.0, y $109 \pm 33.14 \mu\text{m}$ en las tratadas con pH 8.5, este comportamiento coincidió con lo observado en la Fig. 8 en donde se observó una promoción del crecimiento de las raíces en el régimen de pH 5.5 (Fig. 8). La correlación de la longitud de la raíz y la longitud promedio de diez células en la parte media de ésta, para cada tratamiento de pH no fue significativa (Fig. 9). Con los datos obtenidos del conteo del número de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria se construyó la gráfica presentada en la Fig. 10.

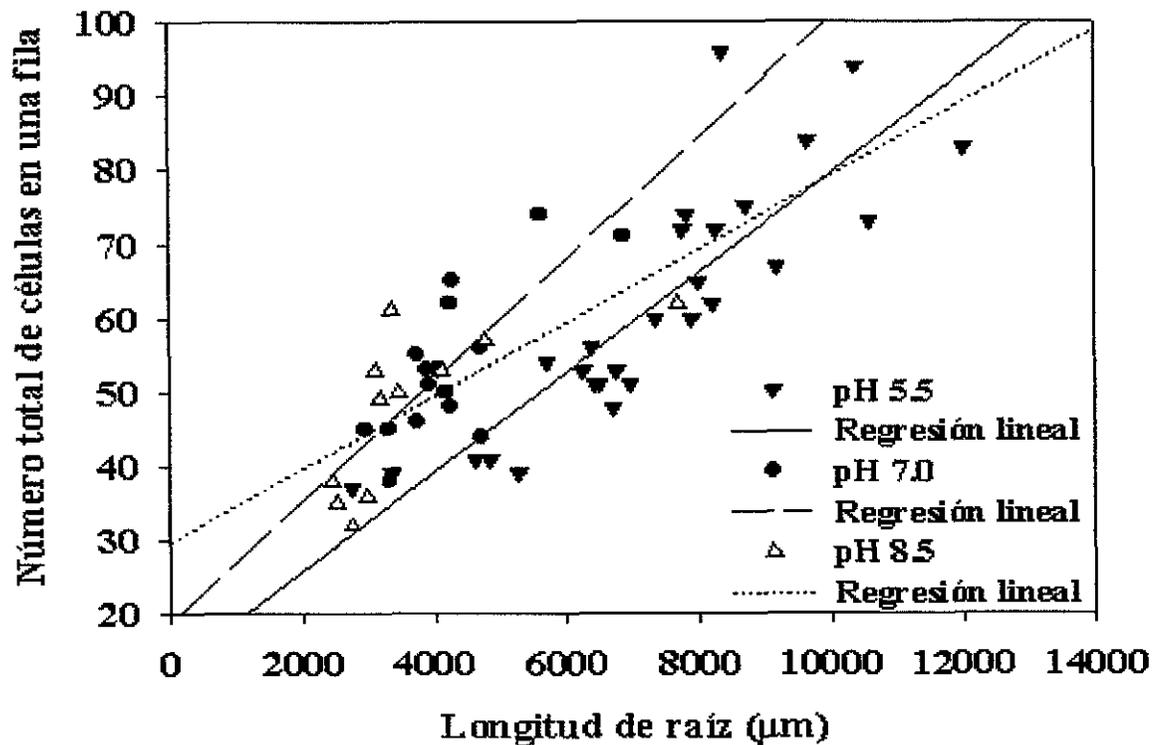


Figura 10.- Longitud de la raíz primaria vs, número de células en una fila en la epidermis de la raíz primaria de *S. gummosus*, en tres regímenes de pH: 5.5, 7.0 y 8.5. Regresión lineal de primer orden: pH 5.5 $y = 0.0067x + 12.08$, ($r^2 = 0.74$, No. = 27); pH 7.0 $y = 0.0082x + 19.00$, ($r^2 = 0.58$, No. = 17); pH 8.5 $y = 0.0049x + 30.68$, ($r^2 = 0.42$, No. de raíces = 11).

El número de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria graficado en función de la longitud de la raíz por tratamiento de pH, muestra que la relación es positiva, de tal forma que el número de células aumentó cuando se incrementó la longitud de la raíz. El intervalo de este parámetro se encontró entre 30 y 95 células en una fila de la raíz y las raíces con un mayor número de células fueron las tratadas en pH 5.5, al contar en promedio con 61 ± 11 células en una fila de la raíz contra 53 ± 12 células en las raíces tratadas con pH 7.0 y 48 ± 14 células en las tratadas con pH 8.5. Se presenta el resultado del ANOVA (Tabla 3).

Tabla 3.- Resumen del análisis de varianza para el efecto del pH en el número de células. Niveles de significancia ** = $p < 0.01$.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
pH	1437.88	2	718.94	3.82
Error	9973.54	53	188.18	-
Total	11411.42	55	907.12	-

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las raíces mantenidas en pH 5.5 y 8.5, pero no hubo diferencia significativa entre las raíces mantenidas en pH 5.5 y 7.0. Al aplicar el análisis de regresión lineal, para observar qué datos se encuentran más relacionados, las líneas de los tratamientos de pH 5.5 y 7.0 explicaron mejor esta asociación ya que el valor de la r^2 obtenido fue significativo con 0.74 y 0.58 respectivamente (Fig. 10).

Al comparar las líneas de regresión de las gráficas de las Figs. 9 y 10 por tratamiento de pH, se observó en las raíces tratadas con pH 8.5 que cuando la longitud de las células es mayor en relación al incremento en la longitud de la raíz, el número de células es menor, y ocurre lo contrario en las raíces del régimen de pH 7.0, en donde ante un menor incremento en la longitud de células se observó un mayor número de células, lo cual podría ser interpretado como un mecanismo en el cual la raíz alcanza una talla mínima creciendo; por el incremento en el número de células o por la elongación de estas, sin embargo los datos que muestran valores más altos son los obtenidos en las raíces tratadas con pH 5.5.

Al aplicar la fórmula propuesta en el MEPC la proliferación celular estimada y los promedios obtenidos fueron los siguientes: 2.86 ± 0.43 ciclos celulares en las raíces crecidas en pH 5.5 y 1.48 ± 0.32 ciclos celulares en promedio en las raíces mantenidas en pH 7.0 y 1.70 ± 0.24 ciclos celulares en promedio en las raíces mantenidas en pH 8.5.

Tabla 4.- Resumen del análisis de varianza para el efecto del pH en el número de ciclos celulares. Niveles de significancia ** = $p < 0.01$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
pH	19.82	2	9.91	3.83
Error	136.74	53	2.58	-
Total	156.56	55	12.49	-

Al aplicar el ANOVA (Tabla 4) se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el pH 5.5 y el tratamiento de pH 8.5.

El crecimiento de la raíz es promovido por un pH ácido, mientras que la planta no mostró diferencias significativa de crecimiento y número de ciclos celulares transcurridos entre un pH neutro y un pH básico, esta respuesta indistinta podría ser interpretado como una adaptación a las variaciones de pH de su hábitat natural y muestra la tolerancia de la planta a ciertas condiciones de basicidad, ya que el suelo de los desiertos es típicamente básico (Evenari, 1985, Tamhane *et al*, 1978) y esto es confirmado ya que en la zona en donde se colectaron las semillas el pH tiene una variación de 8.5 en época de secas y de 7.5 en época de lluvias (Comunicación personal M.C. María Esther Puente). Los resultados mostraron que cambios en el pH pueden afectar el número de ciclos celulares, sin embargo, el pH parece no tener influencia en el patrón de crecimiento determinado ya que este se conservó. La longitud de las células y el número de células elongadas fueron afectados

por cambios en el pH. El pH ácido promovió el crecimiento de las raíces de manera significativa y este incremento se debió a los dos factores que involucran el crecimiento, elongación y división celular (Fig. 9 y Fig. 10). Estos resultados coinciden con lo encontrado en las raíces de *Arabidopsis thaliana*, donde velocidades aceleradas de elongación de la raíz están acompañadas por un incremento en la producción celular en el meristemo, con pequeños cambios en las velocidades de expansión celulares (Beemster y Baskin, 1998). La promoción del crecimiento en pH ácido coincidió también con los resultados obtenidos por Edwards y Scott (1974) y Edwards (1977), donde el pH ácido promovió la elongación de la raíz en maíz. La disminución en el número de células y como consecuencia la disminución en el número de ciclos celulares observados en este trabajo en las raíces mantenidas en pH 8.5 coinciden también con lo observado en *Lupinus angustifolium* donde en pH ácido tiene su óptimo crecimiento y es muy sensible a altos valores de pH, ya que por encima de pH 6 la velocidad de elongación celular disminuye, pero el efecto se revierte si se regresa a sus valores originales y la velocidad de elongación se restituye (Tang *et al*, 1993). En términos generales la promoción del crecimiento en pH ácido podría ser el resultado del aumento en la solubilidad de ciertos elementos como el hierro, el zinc, el cobre y el manganeso en condiciones naturales y que en estas condiciones podrían ser absorbidos más fácilmente por las plantas que en un pH básico (Salisbury, 1992), así como por lo postulado en la teoría del “Crecimiento ácido” que menciona que las células de las plantas crecen más rápido y sus paredes llegan a ser más extensibles en un pH ácido (Edwards y Scott, 1974). El incremento en la longitud de la raíz en un pH ácido muestra que en condiciones óptimas fisiológicas se puede estimular el crecimiento, sin embargo la actividad proliferativa concluye, lo que hace suponer que el crecimiento determinado es consecuencia de limitaciones internas de crecimiento.

4.3.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la raíz primaria.

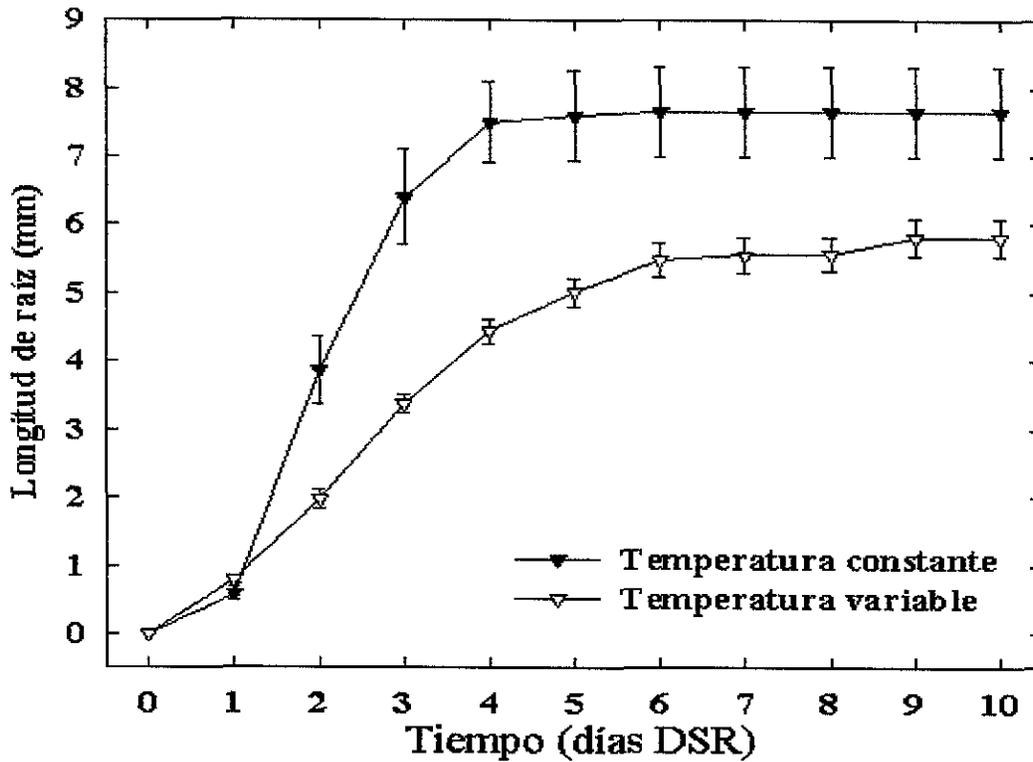


Figura 11.- Crecimiento de la raíz primaria de *S. gummosus* después del surgimiento de la radícula (DSR) bajo dos regímenes de temperatura: condición A = 24 h 30° C; condición B = 12 h 30° C, 12 h 10° C. Se presentan los promedios \pm 1 E.E.

Desde el segundo día DSR se observaron diferencias significativas del crecimiento de las raíces entre los dos regímenes de temperatura. En el caso de la condición A se observó crecimiento hasta el cuarto día DSR, después la curva se hizo asintótica, mientras que en B se registraron cambios en la longitud de la radícula hasta el noveno día. El crecimiento fue mayor en condición A, obteniéndose en promedio una longitud de la radícula de 7.65 ± 0.65 mm contra 5.87 ± 0.29 mm bajo la condición B, por lo que se consideró a la condición A como el óptimo (Fig. 11).

Se efectuó un análisis celular al final del crecimiento de las raíces, y con los datos obtenidos se construyeron dos gráficas. La primera muestra la relación entre la longitud de la raíz primaria y la longitud de las células en una fila de la epidermis (Fig. 12), la segunda muestra la longitud de la raíz primaria y el número de células en una fila de la epidermis (Fig. 13).

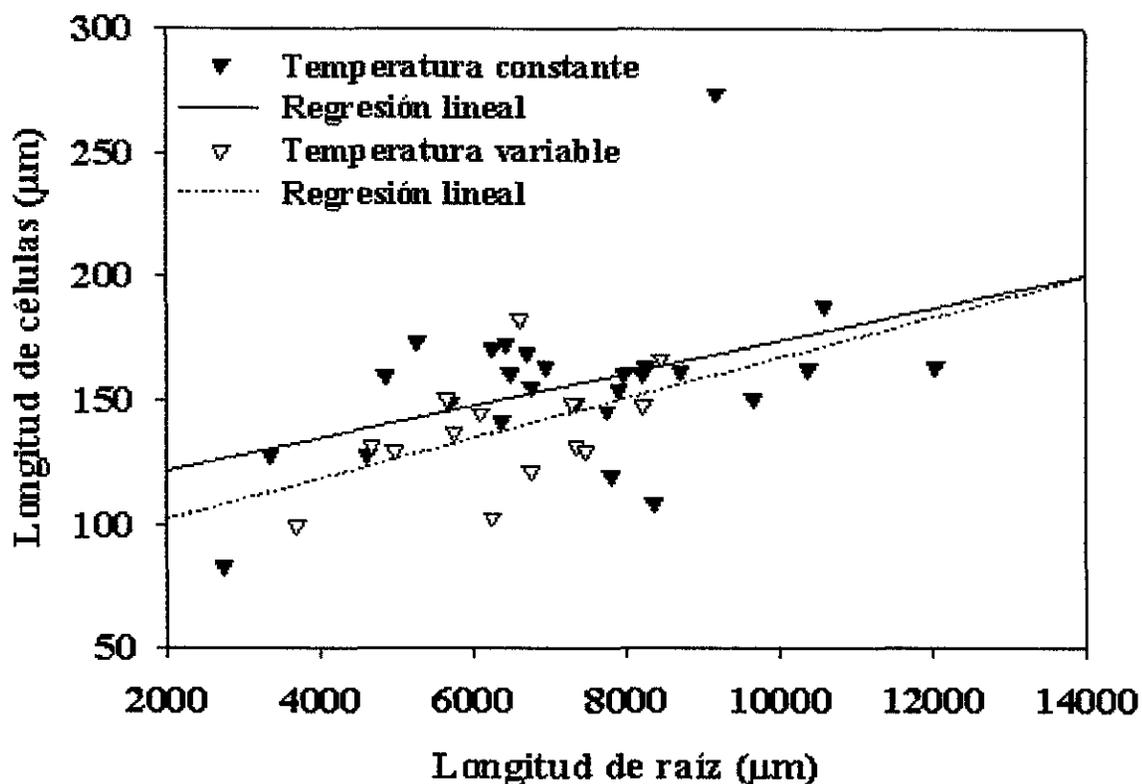


Figura 12.- Longitud de raíz primaria vs longitud de células en una fila de la epidermis de la raíz primaria de *S. gummosus*. Regresión lineal de primer orden: condición A, $y = 0.0066x + 108.50$, ($r^2 = 0.19$, No. = 27); condición B, $y = 0.0081x + 85.87$, ($r^2 = 0.25$, No. = 14).

La longitud de las células se incrementó con la longitud de la raíz en ambos casos, el intervalo de distribución se encontró entre 70 y 190 μm en su mayoría; las raíces que presentaron en promedio un valor mayor fueron las tratadas en el régimen A, al contar con una longitud promedio de $156 \pm 30 \mu\text{m}$ la cual es estadísticamente diferente a la longitud final de $137 \pm 36 \mu\text{m}$ en las raíces tratadas en el

régimen B. La variación entre las dos líneas que representan a las variables es escasa, sin embargo, la diferencia estadística muestra que este factor fue afectado por los cambios en la temperatura.

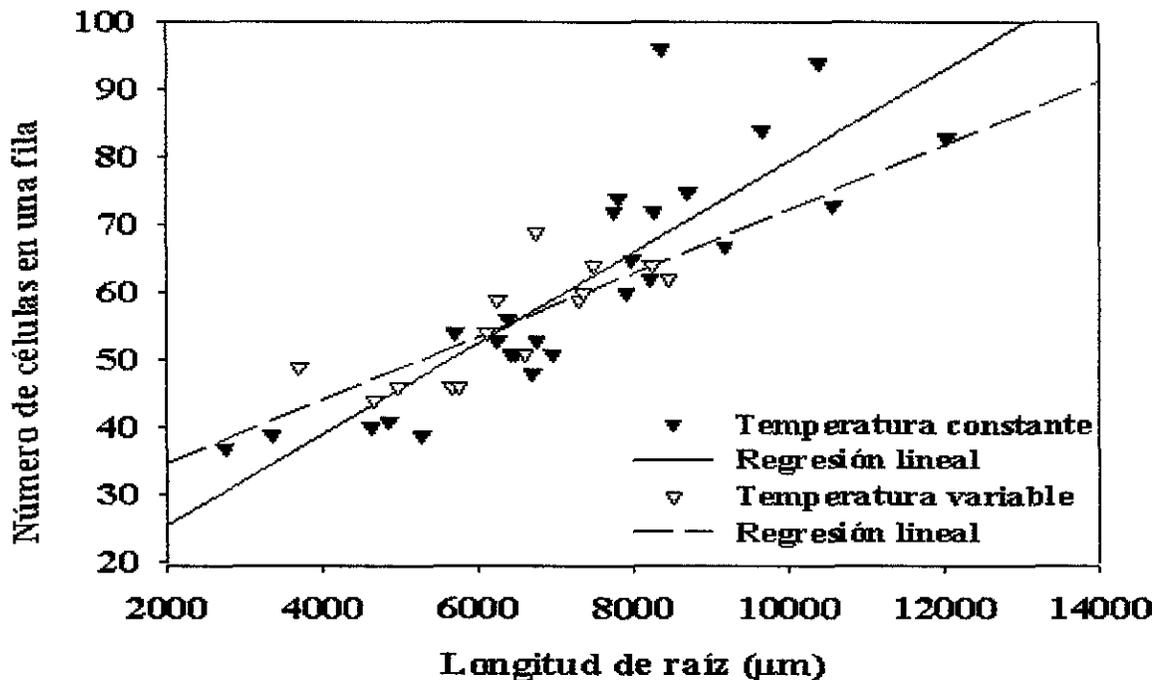


Figura 13.- Longitud de la raíz primaria vs, número de células en una fila de la raíz primaria de *S. gummosus*. Regresión lineal de primer orden: condición A, $y = 0.0067x + 12.08$, ($r^2 = 0.74$, No. = 27); condición B, $y = 0.0047x + 25.06$ ($r^2 = 0.61$, No. = 14).

Al incrementarse el número de células se incrementó la longitud de la raíz, y siendo las líneas de regresión lineal muy similares (Fig. 13). Los valores más altos en el número de células en una fila de la raíz fueron los obtenidos en el régimen A, al contar en promedio con 61 células contra 55 del régimen B, esta diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Los datos obtenidos del conteo celular fueron sustituidos en la fórmula del Método de estimación de la proliferación celular, y el número de ciclos celulares obtenidos en promedio fueron los siguientes: 2.86 ciclos celulares en las raíces mantenidas en condición A, y 1.6 ciclos celulares en las raíces mantenidas en condición B.

Con base en los datos y diferencias estadísticas obtenidas, se deduce que los cambios en la temperatura afectan el crecimiento de la raíz negativamente, ya que en las raíces mantenidas en la

condición B, la longitud de la raíz fue menor debido a que longitudinalmente las células fueron más cortas, y su número en una fila fue inferior en relación a las raíces mantenidas en la condición A.

En el régimen de temperatura constante, se obtuvo la mayor longitud promedio de la raíz, la longitud promedio de diez células en la parte media de la raíz fue mayor significativamente en el régimen A que en el régimen B, lo cual permite suponer que estos parámetros fueron afectados. Así mismo las raíces presentaron también diferencias significativas en el número de células, lo anterior sugiere que la disminución en el tamaño de la raíz podría ser consecuencia de la disminución en los dos parámetros considerados: longitud de las células y número de células. Esto coincide con lo observado en *Pennisetum thipoides* en donde a bajas temperaturas las raíces llegan a ser más cortas y angostas, particularmente la formación de raíces laterales se ve disminuida (Gregory, 1983). La duración del periodo de crecimiento fue de cuatro días en el régimen A contra seis días del régimen B, esta disminución, coincide con lo encontrado en *Pisum sativum*, *Elianthus annuus*, *Tradescantia paludosa*, *Allium cepa* y *Triticum aestivum* en donde la temperatura óptima de crecimiento está siempre cercana al límite superior del ciclo celular, y la duración del ciclo celular es más larga a bajas temperaturas y decrece si la temperatura se eleva.; la velocidad de la división celular determina la velocidad de crecimiento de las células y los órganos (Francis y Barlow, 1988). La causa probable de la disminución de la velocidad de crecimiento es la reducción en la velocidad de acción de las enzimas (Salisbury, 1992).

En nuestro caso es importante señalar que a pesar de que se reduce la velocidad de crecimiento, éste no se suspende ante los cambios drásticos de temperatura, lo que podría interpretarse como una adaptación de la planta a las condiciones que operan en su hábitat natural, en donde las fluctuaciones en la temperatura son aún más extremas.

La temperatura de 30^o C fue la temperatura “óptima” de crecimiento radical, ésta temperatura coincide con la reportada como óptima en otros miembros de la familia como *Mammillaria spp* (Rojas-Aréchiga, 1998), en raíces de maíz (Clowes y Wadekar, 1988) y en especies de otras familias donde la duración más corta del ciclo celular ocurre alrededor de esta temperatura (Francis y Barlow, 1988).

4.3.3. Efecto de fitorreguladores exógenos sobre el crecimiento de la raíz primaria.

Los datos obtenidos de las mediciones diarias de la longitud de la raíz fueron procesados y se construyó una gráfica, la cual se presenta en la Fig. 14.

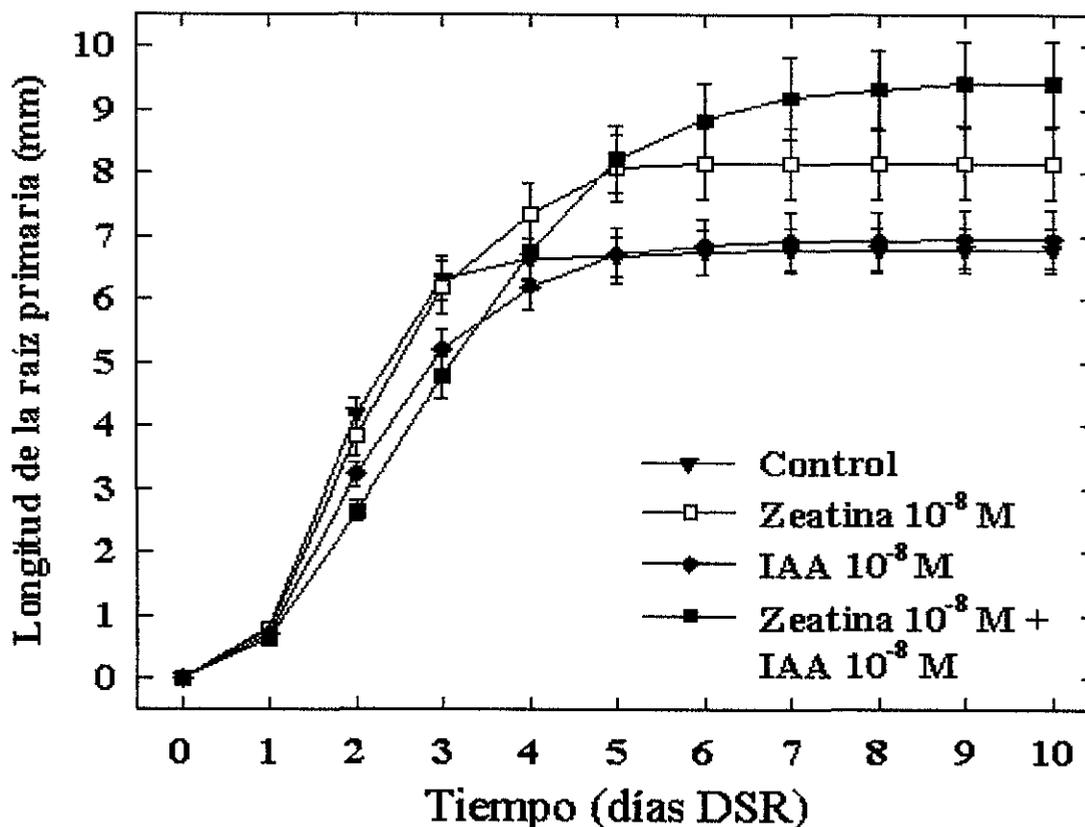


Figura 14- Crecimiento de la raíz primaria de *S. gummosus* después del surgimiento de la radícula (DSR) en tres regímenes con fitohormonas. Se grafican los promedios ($\pm 1E.E$) (No. de raíces = 20 por tratamiento)

El análisis de crecimiento de la raíz primaria mostró que en el tratamiento control las raíces tuvieron un incremento en la longitud de la raíz más rápido que en los que se administraron fitoreguladores, sin embargo, al final del experimento se obtuvo un mayor crecimiento en los tratamientos con fitoreguladores ya que es aventajado por todos los demás regímenes (Fig. 14). En todos los casos el crecimiento concluyó antes del noveno día DSR.

Tabla 5.- Resumen del análisis de varianza para el efecto de fitorreguladores en la loraíz. Niveles de significancia ** = $p < 0.01$.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Fitorreguladores	46661613	3	15553871	2.21
Error	514830784.5	73	7052476.5	-
Total	561492397	76	22606347.5	-

El ANOVA (Tabla 5) realizado para comparar diferencias entre las cuatro variables muestra diferencias significativas entre el control y el tratamiento con Zeatina y la mezcla Zeatina + AIA. La longitud radicular promedio fue de 6.79 ± 0.35 mm para el control, 8.15 ± 0.56 mm con Zeatina y 9.42 ± 0.67 mm con la mezcla Zeatina + AIA, no existiendo diferencia entre el control y el tratamiento de AIA con 6.94 ± 0.46 mm. El promedio en la longitud de la raíz obtenido con el régimen Zeatina + AIA es el más alto de todos los experimentos realizados.

Se obtuvo una promoción significativa del crecimiento radical en el tratamiento mixto de fitoreguladores pero la longitud de las raíces en los tratamientos de Zeatina e IAA aplicados por separado no reportaron diferencias respecto al control, lo cual no coincide con lo encontrado en otras especies en quienes se ha encontrado que las concentraciones usadas en este trabajo han promovido el crecimiento de la raíz (Atzmon y van Staden, 1993).

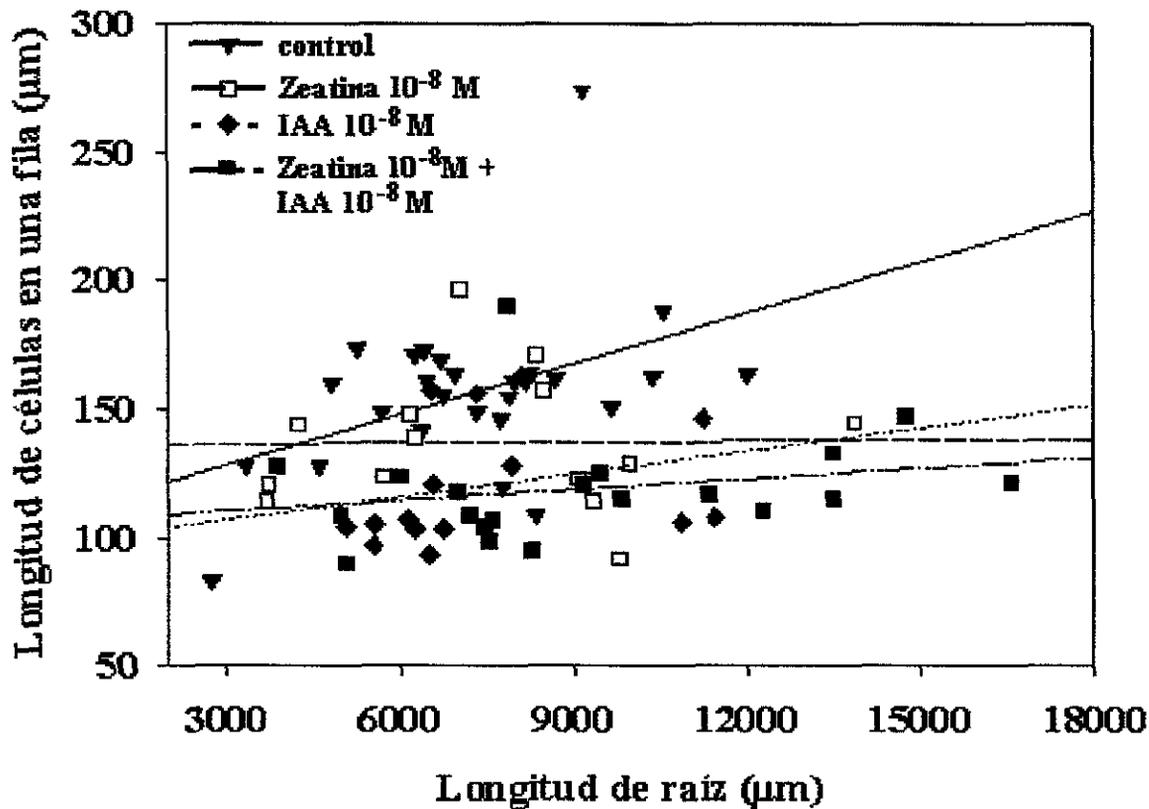


Figura 15.- Longitud de células en una fila de la raíz primaria de *S. gummosus* vs longitud de raíz primaria. Regresión lineal de primer orden: Control $y = 0.0066x + 108.5$, ($r^2 = 0.19$, No. = 27); Zeatina $y = 0.0001x + 136.02$, ($r^2 = 2.06$, No. = 14); AIA $y = 0.003x + 97.90$, ($r^2 = 0.07$, No. = 16); Zeatina + AIA $y = 0.0014x + 106.26$, ($r^2 = 0.05$, No. = 20).

El intervalo en la longitud de las células se encontró entre 100 y 210 μm, contando en promedio con 156 ± 30 μm en las raíces de la caja control, 137 ± 36 μm en las tratadas con Zeatina, 120 ± 32 μm en las tratadas con AIA, y 119 ± 26 μm en las tratadas con el régimen mixto de fitoreguladores. La longitud promedio de diez células de la parte media de la raíz del control fue mayor a la longitud de los regímenes con fitoreguladores.

Tabla 6.- Resumen del análisis de varianza para el efecto de los fitorreguladores en la longitud de las células. Niveles de significancia * = $p < 0.001$.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
fitorreguladores	21078.39	3	7026.13	9.65
Error	53149.11	73	728.07	-
Total	74227.5	76	7754.2	-

El ANOVA (Tabla 6) mostró que existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos de AIA y la combinación de fitorreguladores Zeatina + AIA. Esto sugiere que los fitoreguladores podrían estar actuando como inhibidores de la elongación celular, pero también como promotores del crecimiento radical por división celular. Es conocido que las citoquininas y las auxinas pueden inhibir la elongación de la raíz dependiendo de las concentraciones (Edwards y Scott 1977, Mulkey *et al*, 1982; Bertell y Eliasson, 1992).

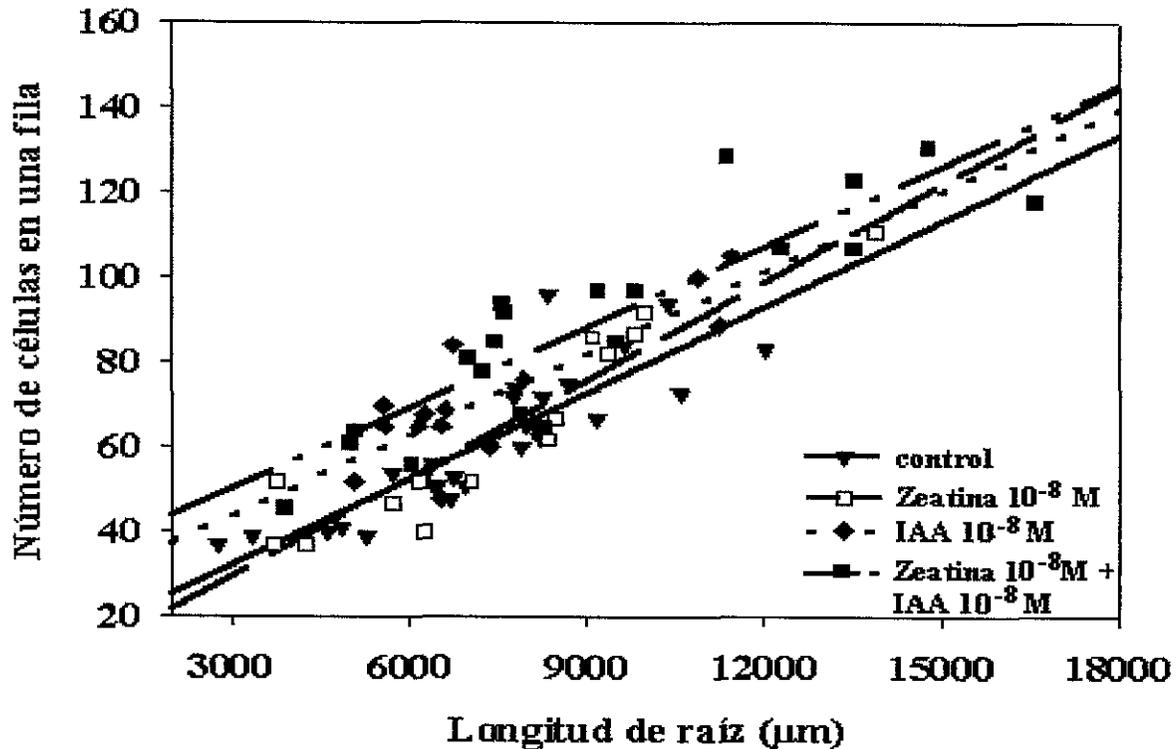


Figura. 16.- Número de células en una fila de la raíz primaria de *S. gummosus* vs longitud de raíz primaria. Regresión lineal de primer orden: control $y = 0.0067x + 12.08$, ($r^2 = 0.74$, No. = 27); Zeatina $y = 0.0077x + 6.63$, ($r^2 = 0.87$, No. = 14); AIA $y = 0.0064x + 24.60$, ($r^2 = 0.68$, No. = 16); Zeatina + AIA $y = 0.0063x + 31.16$, ($r^2 = 0.78$, No. = 20).

El número de células en una fila de la raíz se incrementó al aumentar la longitud de la raíz; las raíces que presentaron un mayor número de células fueron las tratadas con la combinación de Zeatina + AIA, al presentar en promedio 89 ± 19 células en una fila, respecto a 61 ± 11 células en el régimen control, 64 ± 17 células en el régimen de Zeatina y 72 ± 18 células en el régimen de AIA.

Tabla 7.- Resumen del análisis de varianza para el efecto de los fitorreguladores en el número de células. Niveles de significancia * = p < 0.001.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Fitorreguladores	9863.04	3	3287.68	8.08
Error	297000.78	73	406.86	-
Total	280785.04	76	3694.54	-

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7) entre las raíces del régimen control y las raíces mantenidas en el régimen con la mezcla de fitoreguladores, así como entre Zeatina y la mezcla de fitorreguladores, lo cual muestra que la combinación de Zeatina e AIA pueden promover el crecimiento, pero no así los fitorreguladores actuando individualmente. Los fitoreguladores no promovieron el incremento en la longitud de las células, pero sí el número de éstas en una fila, por lo que se deduce que la promoción del crecimiento observado en la raíz, es consecuencia de un mayor número de células producidas por un incremento en el número de divisiones celulares (Figs. 15 y 16).

Al calcular la proliferación celular, transcurren 2.8 ± 0.43 ciclos celulares en promedio en el meristemo de las raíces del control, 3.54 ± 0.72 ciclos celulares en las raíces mantenidas en el régimen de Zeatina, 3.6 ± 0.88 ciclos celulares en las raíces mantenidas en el régimen de AIA, y 5.57 ± 1.24 ciclos celulares en las raíces tratadas con la mezcla de fitoreguladores Zeatina + IAA.

La tabla 8 muestra el resultado del análisis de varianza.

Tabla 8.- Resumen del análisis de varianza para el efecto de los fitorreguladores en el Número de ciclos celulares. Niveles de significancia * = $p < 0.001$.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Fitorreguladores	135.69	3	45.23	8.08
Error	408.8	73	5.60	-
Total	3863.08	76	50.83	-

Se encontraron diferencias significativas entre el régimen control y el de Zeatina + IAA, así como entre el de Zeatina y Zeatina + AIA, lo que muestra que la Zeatina actúa sobre el número de ciclos celulares cuando se combina con AIA. Los fitoreguladores parecen influir en los dos parámetros que involucra el crecimiento: a) división celular, reflejado en un mayor número de células y un mayor número de ciclos celulares y b) la elongación celular, reflejado en el incremento en la longitud celular. El incremento en el número de ciclos celulares, podría ser una respuesta temporal afectando a las células meristemáticas.

La mayor longitud de raíz alcanzada y el mayor número de células en una fila se obtuvo en las raíces tratadas con el tratamiento mixto de fitoreguladores Zeatina + AIA; la mayor longitud promedio de células en la parte media de la raíz se obtuvo en las raíces tratadas con el medio control. La promoción del crecimiento a causa de la combinación de fitoreguladores, muestra que probablemente, la planta es deficiente en la producción de Zeatina y no así de AIA ya que el tratamiento control y AIA no mostraron diferencias significativas, o bien, la produce en concentraciones que son incapaces de inducir el proceso de alargamiento de la raíz, pero que al ser suministrada exógenamente y en combinación con Zeatina favorece el crecimiento.

Con respecto al número de células la combinación de Zeatina + IAA tuvo diferencias significativas respecto a todos los demás tratamientos y el control, a su vez no se diferenció del régimen de Zeatina, y AIA. Este comportamiento sugiere que los fitoreguladores podrían estar actuando de manera sinérgica y antagónica, como se ha observado en tabaco, ya que ambas son requeridas para estimular la división celular pero inhiben la longitud de las células (Skoog y Miller, 1957 en Redig *et al*, 1996).

Como se mencionó anteriormente, la promoción del crecimiento a causa de la combinación de fitoreguladores sugiere que la planta podría ser deficiente en la producción de este tipo de compuestos, pero que al ser suministrados exógenamente y en combinación podrían favorecer su crecimiento.

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en todos los experimentos, y determinar de qué forma el crecimiento se vio afectado en las distintas condiciones monitoreadas, los promedios de la longitud de la raíz, el número de células en una fila la longitud promedio de diez células en una fila, y el número de ciclos celulares se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9.- Comparación de los promedios ± 1 E.E. de los parámetros medidos en todos los experimentos.

Condiciones experimentales	1	2	3	4	5	6	7	8
Longitud de raíz (mm)	5987.5 ± 670	7279.6 ± 1400	4222.1 ± 995	3665.9 ± 1105	6375 \pm 1703	7558.0 ± 2020	7496.9 ± 1919	9167.5 ± 2049
longitud promedio de diez células de la parte media de la raíz (μm)	139.0 ± 15.53	156.5 \pm 30.11	114.8 \pm 27.04	109.9 \pm 33.14	137.8 \pm 36.82	137.0 \pm 36.62	120.3 \pm 32.24	119.0 \pm 26.60
Número total de células en tf	59.4 \pm 6.15	61.1 \pm 11.76	53.4 \pm 12.58	48.5 \pm 14.63	55.2 \pm 14.75	64.6 \pm 17.26	72.4 \pm 18.65	89.2 \pm 19.94
Número de raíces muestreadas	65	27	18	11	14	14	16	20

- 1.- Tratamiento de solución líquida de Hoagland al 10 %
- 2.- Tratamiento control; crecidas en agar con pH 5.5, y temperatura constante
- 3.- Tratamiento en agar en pH 7.0
- 4.- Tratamiento en agar en pH 8.5
- 5.- Tratamiento en agar, en temperatura variable 12 h 10⁰ C, 12 h 30⁰ C
- 6.- Tratamiento en agar, con Zeatina
- 7.- Tratamiento en agar con IAA

8.- Tratamiento en agar con mezcla Zeatina + IAA

La mayor longitud de raíz alcanzada en todos los tratamientos fue en el régimen de Zeatina y AIA.

Para determinar si existen diferencias en la distribución de los ciclos celulares en todos los experimentos realizados, los datos de todos los experimentos, fueron procesados y se construyó una tabla de distribución de frecuencias para cada uno de los experimentos (Tabla 10).

Tabla 10.- Distribución de frecuencias del número de ciclos celulares en los todos los experimentos realizados

Condiciones experimentales	1	2	3	4	5	6	7	8
0 a 1 ciclos celulares	17	1	6	1	5	1	1	1
1 a 2 ciclos celulares	15	7	6	4	2	3	1	1
2 a 3 ciclos celulares	18	5	2	2	6	2	5	3
3 a 4 ciclos celulares	8	5	2	-	1	-	3	1
4 a 5 ciclos celulares	6	2	-	-	-	1	3	2
5 a 6 ciclos celulares	1	-	-	-	-	3	1	3
6 a 7 ciclos celulares		2	-	-	-	-	1	3
7 a 8 ciclos celulares		-	-	-	-	-	1	2
8 a 9 ciclos celulares		-	-	-	-	1	-	1
9 a 10 ciclos celulares		-	-	-	-	-	-	1
10 a 11 ciclos celulares		-	-	-	-	-	-	2

- 1.- Tratamiento en solución líquida de Hoagland al 10 %
- 2.- Tratamiento control; crecidas en agar con pH 5.5, y temperatura constante
- 3.- Tratamiento en agar en pH 7.0
- 4.- Tratamiento en agar en pH 8.5
- 5.- Tratamiento en agar, en temperatura variable 12 h 10⁰ C, 12 h 30⁰ C
- 6.- Tratamiento en agar, con Zeatina
- 7.- Tratamiento en agar con AIA
- 8.- Tratamiento en agar con la mezcla Zeatina + AIA

Las plántulas tratadas con el régimen mixto de Zeatina y AIA fueron las que presentaron un mayor número de ciclos celulares.

La mayor frecuencia en los regímenes analizados fue aleatoria, sin embargo parece estar relacionada con la longitud de la raíz, ya que los datos muestran una tendencia a presentar mayor longitud de la raíz, conforme ocurren un mayor número de ciclos celulares.

La proliferación celular parece ser la máxima en condiciones óptimas de crecimiento, sin embargo, posibles limitaciones internas, probablemente reguladas por los programas genéticos de la planta podrían ser las causantes de que el patrón de crecimiento determinado no sea modificado.

La raíz en *S. gummosus* crece tanto por división celular como por elongación celular, sin embargo, el mayor incremento obtenido en la longitud de la raíz es consecuencia del incremento en el número de células, es decir, por división celular esto es demostrado por la buena correlación obtenida entre el número de ciclos celulares y la longitud de la raíz, la cual tiene un valor de r^2 mayor a la obtenida entre la longitud de células y la longitud de raíz. Es interesante observar, que cuando el incremento en la longitud de las células ocurre en menor medida, el número de células lo hace en mayor nivel al compensarse alguno de los dos aspectos (Rost 1994); la consecuencia es crecimiento, como lo observado en los regímenes con hormonas, en donde los promedios de la longitud promedio de diez células de la parte media de la raíz fueron inferiores a los del régimen control en todos los casos, sin embargo, los promedios en el número de células en una fila fueron mayores al control y también la longitud de la raíz.

Los resultados muestran que la promoción del crecimiento no es controlada solo por factores operando aisladamente, sino en conjunto, como en el caso del régimen mixto de fitorreguladores.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que los fitorreguladores no promueven significativamente la actividad del centro quiescente y por lo tanto la actividad meristemática de la raíz primaria concluye. La función de la organización del meristemo apical de la raíz primaria en *S. gummosus*, es completar su desarrollo rápidamente y promover la formación de raíces laterales, las cuales permitirían el rápido establecimiento de las plantas (Dubrovsky, 1997).

Las limitaciones internas de proliferación celular observadas en la raíz primaria no son generales a las demás raíces, ya que estas pueden tener un crecimiento indeterminado para formar

una sistema radicular extenso que puede alcanzar hasta cinco metros de longitud total (Dubrovsky 1998).

5.- Conclusiones

El patrón de crecimiento determinado no es afectado por factores externos, como la temperatura, el pH en el medio de cultivo y los fitorreguladores administrados exógenamente y, aunque la elongación de la raíz es promovida, la actividad meristemática se termina, lo que sugiere que este patrón de crecimiento responde a un plan genético de desarrollo evolutivamente conservado y no como una adaptación temporal a las condiciones del medio natural.

La temperatura óptima de crecimiento de las raíces de *Stenocereus gummosus* es a 30⁰ C ya que en condiciones variables de temperatura la duración del periodo de crecimiento es más largo y la longitud de las raíces es menor; sin embargo, el crecimiento no fue suspendido en condiciones fluctuantes de temperatura, y el número de ciclos celulares no tuvo cambios significativos, por lo que se considera que este factor puede afectar la duración del ciclo celular pero no el número de divisiones celulares, y este comportamiento podría ser interpretado como una adaptación a las condiciones operantes en su hábitat natural.

La combinación de fitorreguladores en bajas concentraciones puede fomentar la elongación de la raíz, resultado de la elongación de la célula y del incremento en el número de células por un incremento en el número de ciclos celulares transcurridos; sin embargo el incremento en el número de ciclos celulares causado por los fitorreguladores es temporal y el patrón de crecimiento determinado no es afectado, lo que sugiere que este patrón es el resultado de limitaciones internas de crecimiento en la raíz primaria.

El escaso número de ciclos celulares transcurridos en el meristemo apical de la raíz primaria de *S. gummosus* (incrementado levemente por la aplicación de diferentes tratamientos con las condiciones óptimas para el crecimiento de las plántulas), muestra que existen limitaciones internas de proliferación celular en la raíz primaria, probablemente controlados genéticamente, las limitaciones internas obedecen posiblemente a la forma de organización del meristemo apical, que debido a la rápida conclusión de su actividad, permite el desarrollo de las raíces laterales, y como consecuencia el rápido establecimiento de las plántulas. Estas limitaciones internas del meristemo apical están presentes en algunas raíces laterales, sin embargo no son generales a todas las raíces, ya que éstas pueden llegar a alcanzar longitudes similares o mayores a las del tallo de la planta.

6.- Referencias bibliográficas

- Atzmon, N., Van Staden, J. 1993. The effect of zeatin and iso-pentenyladenine on root growth of *Pinus pinea* L. *J. Plant Physiology* 141:366-369.
- Beemster, G., Baskin, T. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116 : 1515-1526.
- Berlyn, G., Miksche, J. 1974. Botanical microtechnique and cytochemistry. *The Iowa state University press*. Iowa.
- Bertell, G., Eliasson, L. 1992. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* 84:255-261.
- Boke, N. 1979. Root glochids and root spurs of *Opuntia arenaria* (cactaceae). *American Journal of Botany* 66:1085-1092.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de Mexico. UNAM. México. Vol. I . 743 p.
- Contreras, L. 1996 Crecimiento de raíz y ciclo celular en algunas Cactáceas del desierto sonorense mexicano. Tesis de licenciatura Universidad Juárez del Estado de Durango.
- Clowes, F., Wadekar, R. 1987. Modelling of the root cap of *Zea mays* L. in relation to temperature. *New Phytologist* 108:259-262.
- Dinkelaker, B., Hengeler, C., Marscher, H. 1995. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanical Acta* 108:183-200.
- Dubrovsky, J. 1996. Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti an its ecological implication. *American Journal of Botany* 83:624-632.
- Dubrovsky, J. 1997a. Determinate primary root growth in *Stenocereus gummosus* (Cactaceae) its organization and role in lateral root development in biology of root formation and development. *Altman and Waisel eds*. New York pp 13-20.
- Dubrovsky, J. 1997b. Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, celular basis, and ecological significance. *Planta* 203:85-92.
- Dubrovsky, J., Contreras-Burciaga, L., Ivanov, V. 1998. Cell cycle duration in root meristem of Sonoran desert Cactaceae as estimated by cell-flow and rate-of cell-production methods. *Annals of botany* 81: 619-624.
- Edwards, K., Scott, T., 1974. Rapid growth responses of corn root segments: Effect of pH on elongation. *Planta* 119: 27-37.

Edwards, K. 1977. Rapid-Growth responses of corn root segments : effect of auxin on elongation. *Planta* 135:1-5.

Esau, K. 1960. Anatomy of seed plants. *John Wiley and Sons* New York pp 227-239.

Evenari, M. 1985. The desert environment in ecosystems of the world. V12a -Hot desert and arid shrublands-Elsevier Amsterdam pp. 1-22.

Francis, D., Barlow, P. 1988. Temperature and the cell cycle. en Symposia of society for experimental biology. *Society for experimental biology* UK pp 181-201.

Garcia, E. 1974. Modificaciones al sistema de clasificación climática de köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) Instituto de geografía. UNAM. 252 p.

Gerrit, T., Baskin, T. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116: 1515-1526.

Gladish, D., Rost, T. 1993. The effects of temperature on primary root growth dynamics and lateral root distribution in garden pea (*Pisum sativum* L., CV "Alaska"). *Environmental and Experimental Botany* 33:243-258.

Gibson, A., Nobel, P. 1986. The cactus primer. Harvard University Press. E.U.A. 128 p.

G, Hendry., J, Grime, J. 1993. Methods in comparative plant ecology. *Chapman and Hall*. London pp 170-173.

Gifford, E., M, Kurth, E. 1982. Quantitative studies of the roots apical meristem of *Equisetum scirpoides*. *American Journal of Botany* 69: 464-473.

Gifford, E. 1993. The root apical meristem of *Equisetum diffusum*: structure and development. *American Journal of Botany* 80 : 468-473.

Gregory, P. 1983. Response to temperature in a stand of pearl millet (*Penmisetum thipoides*). VIII. Root development. *Journal of experimental Botany* 31: 379-388.

Gunning, B., Hughes, J., Hardham, A. 1978. Formative and proliferative cell divisions, cell differentiation, and developmental changes in the meristem of *Azolla* roots. *Planta* 143: 121-144.

Hasenstein, K., Evans, M. 1986. Calcium-dependence of rapid auxin action in maize roots. *Plant Physiology* 81: 439-443.

Hasenstein, K., Evans, M. 1988. The influence of calcium and pH on growth in primary roots of *Zea mays*. *Physiology Plantarum* 72:466-470.

INEGI. 1995. Síntesis geográfica del estado de B.C.S. INEGI México D.F.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Ivanov, V.B. 1981. Cellular basis of root growth. *Sovietic Science Review D2*:356-392.
- Ivanov, V.B. 1994. Root growth responses to chemicals. *Sovietic Science Review D.Physicochemistry. Biology* 13:1-70.
- Ivanov, V.B., Dubrovsky J.G. 1997. Estimation of the cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *International Journal of .plant sciences.* 158:757-763.
- Kafkafi, U., Waisel, Y., Eshel, A. 1995. Preface in Plant Roots. Marcel Dekker, inc. U.S.A. p iii.
- León de la Luz, J., Domínguez-Cadena. 1991. Evaluación de la reproducción por semilla de la pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) en Baja California Sur. *Acta Botánica Mexicana* 14:75-87.
- Leon de la Luz, J., Domínguez, R., Cruz-Estrada, M., Rodríguez-Estrella, R. 1995. Reproductive phenology of *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson & Horak. Implications for its cultivation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42:61-67.
- Martin, H., Elliot, M. 1984. Ontogenetic changes in the transport of indol3yl- acetic acid into maize roots from the shoot to cariposis. *Plant Phisiology.* 74 : 971-974.
- MacLeold, R. 1976. The development of lateral root primordia in *Vicia faba* L. Their response to colchicine. *Annals of Botany* 40: 551-562.
- Maya, Y. 1995. Fenología, producción y descomposición de hojarasca de las especies dominantes de una comunidad vegetal de zonas áridas. Tesis Maestría Facultad de Ciencias. UNAM. 93 p.
- Mendoza Carrión Gabriela. 1998. Organización del meristemo apical de la raíz primaria con crecimiento determinado de *Stenocereus gummosus* (Cactaceae) y su posible importancia adaptativa en condiciones áridas. Unam Iztacala. 65 p
- Mulkey, T., Kuzmanoff, K., Evans, M. 1982. Promotion of growth and hydrogen ion efflux by auxin in roots of maize pretreated with ethylene biosynthesis inhibitors. *Plant Physiology* 70:186-188.
- Nobel, P. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University press New york 270 p.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of british mycological society* 55:158-160.
- Pilet, P., Elliot, M.C., Moloney, M.M. 1979. Endogeneous and exogeneous auxin in the control root growth. *Planta* 146:405-408.
- Pimienta-Barrios, E., Nobel, P. 1994. Pitaya (*Stenocereus spp.*, Cactaceae): an ancient and modern fruitcrop of México. *Economic Botanic* 48:76-83.

- Pimienta, E., Robles, C., Domínguez, A. 1995. Estrategias fisiológicas y reproductivas de adaptación del pitayo a la aridez. *Ciencia* 46:339-349.
- Radermacher, E., Klämbt, D. 1993. Auxin dependent growth and auxin binding proteins in primary roots and roots hairs of corn (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology* 141: 698-703.
- Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Onckelen, H. 1996. Levels of endogenous cytokinins, indole3-acetic acid and abscisic acid dsuring the cell cycle of synchronized tobacco By-2 cells. *Federation of european boichemical societies* 391: 175-180.
- Rojas-Arechiga, M., Vazquez-Yañez, C. 1998. Seed response to temperature of Mexican cacti species from two diferent forms: an ecophysiological interpretations. *Plant Ecology* 135: 207-214
- Rost, Thomas. 1994. Root tip organization and the spatial relationship of differentiation events. en Iqbal, Muhammed, eds. Growth patterns in vascular plants. U.S.A. *Diosearides press* pp 59-70.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. México *Limusa* 432 p.
- Salisbury, F. 1992. Plant Physiology. N.Y. *WPC* 679 p.
- Schiefelbein, J. W., Masucci, J. D., Wang, H. 1997. Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.
- Skene, K., Kierans, M., Sprent, J., Raven, J. 1996. Structural aspects of cluster root development and their possible significance for nutrient acquisition in *Grevillea robusta* (Proteaceae). *American Botanic* 77:443-451.
- Taiz, L., Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. The Benjamin, Cummings Publising Company, inc. Redwood City, California, U.S.A. 550 p.
- Tamhane, R., Motirano, D., Barli, Y., Donahue, R. 1978. Suelos: su química y su fertilidad en zonas tropicales. Diana. México 483 p.
- Tang, C., Kuo, J., Longnecker, N., Thomson, C., Robson, A. 1993. High pH cause disintegration of the root surface in *Lupinus angustifolius*. L. *Annals of Botany* 71:201-207.
- Thompson, A., McLeold, R. 1981. Increase in size and cell number of lateral root primordia inthe primary of intact plants and excised roots of *Pisum sativum* and *Vicia faba*. *American Journal of Botany* 68: 955-964.
- Webster, P., MacLeod R. 1996. The Root apical meristem and its margins. en Half, Hidden. 1996. Plant Roots. Marcel Dekker, inc. U.S.A. pp. 31-76.
- Van't, H. 1985. The cell division cycle in plants. Bryant, J.A., Francis, D., (eds.) *Cambridge University Press*, Cambridge pp 1-13.

Varney, G., McCully, M. 1991. The branch roots of *Zea.mays* II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytology* 118: 535-546.

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K. 1992. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiology* 94:415-421.

Zar, Jerrold., 1984. Biostatistical analysis. *Prentice All.* New Jersey. U.S.A. 718 p.