

00322
170



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BASES CELULARES DEL AGOTAMIENTO DEL MERISTEMO APICAL DE LA RAIZ CON CRECIMIENTO DETERMINADO EN CACTACEAS DEL DESIERTO SONORENSE.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas UNAM a difundir en formato electrónico e impresa contenido de mi trabajo recepción.

NOMBRE: Jose Fernando Rodriguez Rodriguez

FECHA: 9 Julio 2003

FIRMA: Fernando R

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE FERNANDO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSEPH GRIGORIEVICH DUBROVSKY



2003



L. A.



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.



GOBIERNO FEDERAL
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Bases celulares del agotamiento del meristemo apical de la raíz con crecimiento determinado en cactáceas del Desierto Sonorense."

realizado por José Fernando Rodríguez Rodríguez

con número de cuenta 9650530-0, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Joseph Grigorievich Dubrovsky

Propietario Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces

Propietario M.en C. Guillermina Murguía Sánchez

Suplente Dr. Alfonso Valiente Banuet

Suplente Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Joseph De Groot
Guadalupe
G. Murguía
Alfonso Valiente Banuet
Márquez

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

1.0

Bases celulares del agotamiento del meristemo apical de la raíz con crecimiento determinado en cactáceas del Desierto Sonorense.

José Fernando Rodríguez Rodríguez^a, Joseph G Dubrovsky^b

CONTENIDO

Resumen	2
Introducción	3
Objetivos	7
Métodos y material vegetal	8
Resultados	9
Discusión	19
Referencias	26
Apéndices:	
I. Sobre la biología de Cactáceas	31
II. Sobre el desarrollo en las raíces	34
III. Procedimientos metodológicos	41

^a Facultad de Ciencias, UNAM

^b Director de Tesis, Instituto de Biotecnología, UNAM

RESUMEN

En este trabajo se presenta una caracterización celular de los meristemas de la raíz primaria de las especies *Stenocereus gummosus* y *Pachycereus pringlei*, plantas desérticas de la familia Cactaceae en las cuales el crecimiento del órgano se ve interrumpido en etapas post-germinativas. Se hace una descripción histológica de la morfología interna del ápice y se evalúa la proliferación celular en distintas regiones del meristemo por métodos inmunohistoquímicos. Los resultados muestran que los procesos morfogenéticos están muy limitados en las especies estudiadas y que la terminación del crecimiento de la raíz se relaciona con la ausencia o el breve establecimiento del centro quiescente. El trabajo incluye dos apartados temáticos, el primero es una breve descripción de la biología de cactáceas; el segundo trata del crecimiento de las raíces en general y los elementos para el análisis de su desarrollo.

INTRODUCCIÓN

La raíz de las plantas es el órgano por medio del cual ellas se sostienen y adquieren el agua y los solutos necesarios para su supervivencia. Al igual que el tallo, la raíz se desarrolla a partir de una región apical llamada meristemo, que se encarga de producir nuevas células y dentro de la cual se mantiene una población de células indiferenciadas, capaces de organizar el crecimiento y de generar los diferentes tipos celulares presentes en los tejidos maduros. El funcionamiento de los meristemas ha sido tema de estudio de la biología del desarrollo por muchos años y en la actualidad las principales investigaciones se dirigen hacia la búsqueda de genes que al estar mutados modifican la organización del meristemo causando la interrupción del crecimiento de la raíz. De este modo se van descubriendo mecanismos o procesos que afectan de uno u otro modo la estabilidad del meristemo y el crecimiento sostenido de la raíz.

El objeto de estudio de este trabajo es el meristemo apical de la raíz primaria de algunas especies de cactáceas del desierto sonorense. La particularidad que presentan estas raíces es la de detener su crecimiento de forma natural y programada (a juzgar por la uniformidad en las poblaciones, Fig. 1) cuando han transcurrido pocos días después de la germinación (Dubrovsky, 1997). La importancia que tiene este sistema para el estudio del desarrollo de raíces, es que no se trata de una línea mutante conseguida en condiciones de laboratorio sino de un mecanismo adquirido por algunas especies durante la evolución; algo como un "mutante natural" que promete ser de gran utilidad para esclarecer los

detalles sobre la organización del crecimiento radical. Sin embargo, para poder iniciar los estudios al nivel molecular primero se debe contar con una caracterización celular del sistema, de lo cual trata el presente trabajo.

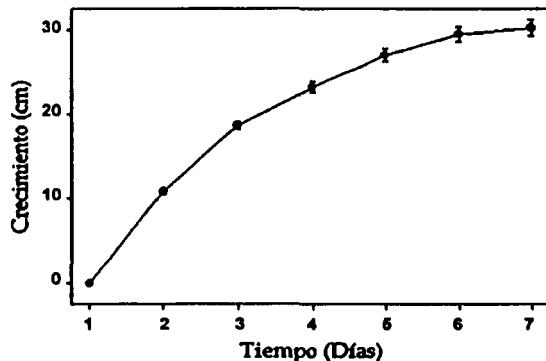


Fig 1. Dinámica de crecimiento de *P. pringlei*. Medias del crecimiento radical de 12 plántulas durante seis días desde la germinación (barras de error = intervalos de 95% de confianza)

Células iniciales y centro quiescente. El cuerpo primario de las raíces de las plantas se deriva en su totalidad, de unas pocas células, que se localizan dentro de los meristemas apicales y reciben el nombre de células **iniciales**, por que hasta ellas se puede trazar el origen de todas las demás células dentro de la raíz. Las células iniciales se encuentran rodeando una zona llamada **centro quiescente (CQ)** dentro de la cual, los tiempos de duplicación celular están aletargados hasta 10 veces su duración en las células circundantes del resto del meristemo (Clowes, 1976, 1982). Las iniciales pueden renovarse al ser desplazadas de la periferia del CQ por una célula que ha sido expulsada de éste como consecuencia de las divisiones

periferia del CQ por una célula que ha sido expulsada de éste como consecuencia de las divisiones ocasionales que ocurren en su interior (Apéndice II). Desde que fue formalizado conceptualmente (Clowes, 1958) el centro quiescente ha mostrado ser fundamental en todos los procesos de crecimiento y regeneración de las raíces (ver Apéndice II).

El estado actual del conocimiento ha llevado a algunos autores a llamar a las células iniciales como células madre *-stem cells-* (Weigel y Jürgens, 2002; Sabatini et al., 2003), en un intento por integrar los sistemas vegetales a los conceptos aplicados en desarrollo animal.

Las células madre son células con un potencial proliferativo extenso, capaces de originar uno o más tipos celulares. Pueden operar de manera “estacionaria” generando una nueva célula madre y una célula de tejido por cada evento de división (Spradling et al., 2001). Su permanencia en el estado indiferenciado, dentro de micro-ambientes llamados nichos, depende de señales generadas localmente por células adyacentes a las células madre que pueden considerarse como parte del nicho (Spradling et al., 2001). En el caso de las células iniciales de

la raíz de las plantas se ha demostrado que su determinación está dada por procesos inductivos (van den Berg et al., 1995) y que las señales encargadas de mantener su estado indiferenciado provienen del CQ (van den Berg, et al., 1997). Los experimentos de destrucción selectiva de células por rayo láser sugirieron que el CQ es equivalente a dicho conjunto de células del nicho, al mostrar que la obliteración de una de ellas provoca que las iniciales adyacentes adquieran características y marcadores de células diferenciadas.

Resulta de particular importancia el descubrimiento reciente del papel que juega el gen SCARECROW (SCR) en la auto-especificación del centro quiescente (Sabatini et al., 2003). Utilizando líneas de *Arabidopsis* diseñadas para expresar de forma controlada genes en tejidos específicos, estos autores expresaron el gen en diferentes regiones del meristemo de plantas *scr-1* (mutantes del gen) incapaces de formar un centro quiescente y cuyo patrón de crecimiento radical es similar al de las cactáceas del presente estudio. El resultado fue que el patrón de desarrollo normal no podía ser reestablecido completamente por la expresión de SCR en ningún tejido fuera del CQ, sólo expresándolo en endodermis y CQ, de donde concluyen que la expresión en el borde exterior del cilindro central (endodermis y CQ) se suma a alguna señal posicional para determinar la identidad de las células del CQ. Por otro lado la expresión del gen HBT (*hobbit*) ha sido relacionada con la identidad de la célula hipófisis -presente desde la etapa de ocho células en el embrión de *Arabidopsis-* y de sus descendientes, el centro quiescente y las iniciales de la cofia (Willemsen et al., 1998).

Una clave más para entender el establecimiento del centro quiescente proviene de las mediciones del estado oxidativo de las células en distintas regiones del meristemo. En particular, ahora se sabe que las formas oxidadas del ácido ascórbico (AA) y del glutatión (GSH) son predominantes dentro del CQ y las formas reducidas fuera de él (Jiang et al., 2003). En el mismo trabajo se estableció el papel preponderante que tiene la distribución de la hormona vegetal auxina, en la determinación del estado oxidativo del centro quiescente. El punto de máxima concentración de auxina se localiza en las células

iniciales de la columela (aquellas que dan origen a la cofia) adyacentes a la frontera apical del CQ; este punto máximo puede ser desplazado experimentalmente (Jiang et al., 2003). Una forma de hacerlo es retirando quirúrgicamente la cofia, con lo que se invierte la relación de formas oxidadas y reducidas de AA y GSH dentro y fuera del CQ. La consecuencia de esta operación es la activación de las células del CQ, con lo cual se regenera una nueva cofia y posteriormente se reestablece el centro quiescente (ver Apéndice II). Otra forma de variar la ubicación del gradiente de auxina es mediante el uso de bloqueadores del transporte polar de ésta como el ácido naftilftalámico o NPA (Jiang et al., 2003) o por mutaciones en genes relacionados con tales transportadores como es el caso de PID (Benjamins et al., 2001). En cualquier caso, los cambios en el estado oxidativo de las células parecen preceder o al menos acompañar a las disfunciones que conducen a la pérdida del centro quiescente (por la activación de las células que lo componen) y a la interrupción del crecimiento radical. La relación que la auxina puede tener con estos cambios no ha sido completamente esclarecida, pero se sabe que estimula la síntesis de la enzima ácido-ascórbico-oxidasa (Kerk y Feldman, 1995) cuyo producto es la forma oxidada del AA tan abundante en el centro quiescente. Respecto al glutatión, se conoce el gen RML (*root-meristem-less*) responsable de la biosíntesis de esta molécula (Vernoux et al., 2000) y cuyos mutantes *rml1-1* y *rml1-2* agotan invariablemente su meristemo radical alrededor de 15 días después de la germinación (Cheng et al., 1995)

Por último el gen *Cak 1 At* (por *cyclin activated kinase*) regula el estado indeterminado de

las células iniciales actuando sobre el control del ciclo celular y frenando los procesos de diferenciación (Umeda et al., 2000).

Los 5 genes recién mencionados producen, cuando son mutados, el patrón de crecimiento y la morfología externa que también se observa en las cactáceas aquí estudiadas. En los cinco casos, los procesos de diferenciación se completan a lo largo de todo el ápice en dirección acropétala* (Fig. 2B).

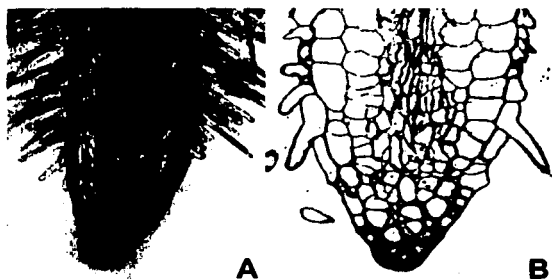


Fig 2. Apariencia de raíces tras el agotamiento meristemático. (A) raíz no seccionada de *S. gummosus* mostrando la invasión del ápice por los pelos radicales. Y (B) el mismo patrón en una raíz de *Arabidopsis* mutada en el gen HBT, esencial para la formación del meristemo. (A, tomado de Dubrovsky, 1997; B, modificado de Willemsen, 1998)

El CQ está presente en las raíces de gimnospermas y angiospermas. Las raíces de los helechos poseen en la región distal del ápice, una célula tetraédrica más grande que las demás, que se divide con menos frecuencia y que al igual que el centro quiescente, tiene la capacidad de regenerar a todo el órgano (Barlow, 1995). Durante la evolución, el CQ apareció en las gimnospermas como un carácter ventajoso para organizar y mantener el crecimiento de raíces más complejas que las que hasta el momento estaban presentes en las pteridofitas. Al ser indispensable para la supervivencia de los

* De la base del órgano al extremo distal.

individuos, esta característica pasó filogenéticamente a las angiospermas; sin embargo, en ciertos miembros de la familia Cactaceae, parece haberse dado una reversión hacia la falta de un establecimiento propio del CQ en etapas post germinativas.

La observación del crecimiento determinado en raíces primarias de cactáceas, fue primero reportada para *Stenocereus gummosus*, *S. thurberi* y *Ferocactus peninsulæ* (Dubrovsky, 1997). La raíz primaria, aquella de origen embrionario que emerge durante la germinación, deja de crecer y completa su diferenciación, aun si las condiciones son óptimas para su desarrollo; los pelos radicales que normalmente se mantienen a distancia del ápice, terminan por cubrirlo todo (Fig. 2A). Se ha hipotetizado que el mecanismo representa una adaptación de algunas cactáceas al medio árido. La evidencia sugiere que el patrón de desarrollo puede repercutir positivamente sobre el establecimiento exitoso de las plántulas, ya que el agotamiento del meristemo apical induce la formación de raíces de segundo orden que al agotarse ellas mismas repiten el patrón en órdenes subsecuentes, dotando rápidamente a las plántulas de un sistema radicular compacto y profuso, que maximiza la absorción de agua y compuestos minerales (Dubrovsky, 1997). Aparentemente, el único caso en la literatura que relaciona un patrón de crecimiento determinado en especies silvestres, con la ausencia del centro quiescente, es el trabajo de Raju et al. (1964) con raíces laterales de *Euphorbia esula*, sin embargo estas raíces son de origen secundario mientras que en los cactus, es la raíz primaria quien lo presenta (y de ahí su importancia). El objetivo de ese grupo, fue comparar dos tipos de raíces -largas y cortas-

presentes en dicha especie. Interesantemente, encontraron que en las raíces cortas no se podía detectar la formación de un centro quiescente pero sí en las raíces largas.

Los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el crecimiento determinado no son conocidos, pero representan una alteración del programa de desarrollo de raíz primaria que observamos en la mayoría de las plantas, cuyas raíces primarias crecen de modo indeterminado.

Las especies estudiadas. La duración del período en el cual estas raíces de cactus completan su crecimiento varía de una especie a otra, pero es bastante similar entre los miembros de una misma especie. De las dos especies escogidas para este estudio, *Stenocereus gummosus* y *Pachycereus pringlei*, la primera es de particular importancia por la brevedad con la cual su raíz primaria se desarrolla y lo rápido que agota su meristemo. Esto sucede alrededor de tres días después de la emergencia de la radícula (Dubrovsky, 1997a, b) y la convierte en una especie “modelo” para la caracterización del crecimiento determinado. Por otro lado, en *Pachycereus pringlei* el fenómeno fue descrito más recientemente (Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). Por tener tiempos de agotamiento más largos que los de las otras especies, en un principio se pensó que en *P. pringlei* podían coexistir ambos patrones de crecimiento (Dubrovsky, 1998). En esta especie, el meristemo apical de la raíz primaria tiene un tiempo de agotamiento de aproximadamente ocho días (Dubrovsky, Gómez-Lomelí, 2003) con un período de crecimiento sostenido (Fig. 1) entre los dos y cinco días, en el cual se comporta de modo similar a las raíces con crecimiento indeterminado. El estudio

de los cambios que posiblemente ocurren en esta transición hacia el agotamiento, es de particular importancia para entender la dinámica interna de las raíces con crecimiento determinado, ya que en esta segunda especie se presenta el crecimiento sostenido, seguido de su terminación, en la misma raíz.

La descripción de este fenómeno se ha hecho con base en la morfología externa. Pero ni la organización del meristemo, ni las bases celulares o moleculares del proceso de agotamiento han sido investigadas a fondo; sin embargo, es muy probable que una alteración en la actividad de las células iniciales o del centro quiescente, juegue un papel importante en este mecanismo. Es necesario poner a prueba esta hipótesis, para comprender de este proceso de desarrollo radical. En especial, saber si el CQ se establece o no en las especies estudiadas.

Desde la segunda mitad del siglo XX, se ha realizado mucha investigación, sobre la importancia

que tiene el centro quiescente en la regulación del crecimiento de las raíces. En muchos casos se ha utilizado la Timidina tritiada como marcador radioactivo de la síntesis de DNA; sin embargo, existen métodos de marcaje no radioactivo que son menos dañinos para la planta por lo que no interfieren tanto con los resultados y su manejo en el laboratorio es más seguro. En particular, se puede emplear la detección por anticuerpos de la Bromo-desoxi-Uridina (**BrdU**), otro análogo de Timidina. Este método será empleado aquí para ampliar el conocimiento sobre el crecimiento determinado desde el punto de vista de la división celular en los meristemas apicales de raíz. Para realizar una caracterización de lo que son los meristemas de raíces con crecimiento determinado en cactáceas se dispone de las técnicas y tinciones histológicas así como del análisis de la proliferación celular por conteo de figuras mitóticas.

OBJETIVOS

Caracterizar la organización del meristemo apical de las raíces primarias de *Stenocereus gummosus* y *Pachycereus pringlei*, y proponer una explicación sobre las causas inmediatas del patrón de crecimiento determinado.

En particular:

- Determinar los cambios que sufre la organización del ápice desde la germinación hasta el agotamiento meristemático en forma cualitativa y cuantitativa.
- Identificar poblaciones celulares dentro del meristemo apical en relación a su actividad proliferativa, usando métodos no radioactivos y estimar la dinámica de agotamiento del meristemo analizando la distribución de figuras mitóticas a lo largo de la raíz durante su desarrollo.
- Verificar la hipótesis que supone que el centro quiescente no se establece durante el desarrollo de estas especies.

MÉTODOS Y MATERIAL VEGETAL

Nota: En el Apéndice III se pueden consultar los procedimientos con mayor detalle.

Material vegetal. Semillas de *P. pringlei* y *S. gummosus* colectadas en los alrededores de La Paz, BCS, en junio del 96 y diciembre del 99, fueron desinfectadas con hipoclorito (Cloralex) al 60% y sembradas en placas con medio Hoagland 0.2 X y agar al 0.8%. Una vez germinadas fueron transferidas a cajas Petri en posición vertical y mantenidas ahí hasta el momento de su fijación, o transferencia a medio con Bromo-desoxi-Uridina (BrdU) a los 0, 2 y 4 días para *S. gummosus* y 2 y 5 días en el caso de *P. pringlei*. Se utilizaron dos soluciones fijadoras: glutaraldehído 1.5% + para-formaldehído 0.3% en buffer PIPES 0.025 M (1) y para-formaldehído al 2% en buffer de fosfatos 0.1 M (2). Optando finalmente por la segunda opción, se deshidrató en serie de etanol, posteriormente, se infiltraron e incluyeron los ápices con resina hidrofílica Historesin (Leica). El material fue cortado en secciones longitudinales de 3 μm de grosor (micrótomo Leica RM2155).

Histología. Los cortes se trataron con las técnicas de tinción de PAS para polisacáridos insolubles (paredes celulares y almidón) y de Feulgen para ácidos nucleicos, la hidrólisis con HCl para esta última se hizo a una concentración de 5 N durante

1 h, a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron contrastadas con azul de toluidina. En los cortes para epifluorescencia se usó la tinción con DAPI (hidrocloruro de 4',6'-diamidino-2-fenilindol) para ácidos nucleicos, a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de glicerol al 50% con propilgalato al 0.15% como agente anti-decolorante, por lo menos 15 min antes de la observación. Parte del material vivo, fue teñido con yoduro de propidio por 10 min a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para la observación de apoplasto en el microscopio confocal.

BrdU e Inmunohistoquímica. Las plantas fueron seleccionadas en tres distintas etapas de su desarrollo e incubadas por 24 h en el mismo medio con BrdU 10 mM pero con agar (0.6%) para facilitar la total inmersión de las raíces sin dañar los ápices. Después de la incubación con BrdU las raíces fueron fijadas, incluidas y cortadas de la forma ya descrita. Los cortes fueron hidrolizados con HCl 1N por 1 h a 37 °C, neutralizado éste con buffer de boratos y lavando los cortes tres veces con PBS 1X. Se aplicó el anticuerpo primario (IgM-ratón) contra BrdU en dilución de 1:10 (BrdU labeling detection kit I, Boehringer) por 2 h a 37 °C y posteriormente el secundario contra IgM de ratón acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) 1:10 por 3 h a 37

°C. Finalmente se adicionó el DAPI, en la forma ya descrita.

Microscopía y manejo de imágenes. Para la descripción morfológica, se usó iluminación de campo claro en un microscopio Olympus BX51. Las preparaciones inmunohistoquímicas, se observaron en el microscopio Zeiss Axioscope con epifluorescencia y filtros para FITC y DAPI. El número total de núcleos (tinción con DAPI) se comparó con el número de núcleos marcados por BrdU con señal de FITC, además se decidió usar una combinación de epifluorescencia para DAPI e iluminación de campo claro que permitiera definir la posición de los núcleos dentro de la raíz. En la computadora se hizo un montaje de estas imágenes con las de FITC para facilitar el conteo por tejidos del porcentaje de células marcadas.

Análisis de los datos. En total se analizaron 90 raíces de *S. gummosus* (52 para morfología y 38 para inmunohistoquímica) y 28 de *P. pringlei* (12 para dinámica de crecimiento y 16 para inmunohistoquímica). Las comparaciones entre etapas se hicieron bajo la prueba de *t* de Student.

RESULTADOS

Análisis anatómico-morfológico del desarrollo de la raíz.

A pesar de que las raíces para el estudio morfológico del desarrollo se obtuvieron a partir de tres o seis tiempos diferentes (12, 24, 36, 48,

Nomenclatura – definición de promeristemo.

Clowes definió al promeristemo como el grupo de células que da origen a todos los tejidos futuros; más tarde este grupo fue equiparado con el centro quiescente (Clowes 1961). En el presente trabajo se retoma el concepto de promeristemo porque se desconoce *a priori*, si estas raíces poseen propiamente un centro quiescente. Para localizar el promeristemo en cada raíz de forma sistemática -y disminuir así la subjetividad que implica delimitar una zona arbitrariamente- se decidió proceder de la siguiente manera: Se incluyen las células de la primera hilera de la columela (correspondientes a las iniciales de la cofia central) fácilmente identificables por su morfología y disposición en línea. A este grupo se agregan aquellas células adyacentes en dirección basal, cuya identidad, respecto al tejido al cual pertenecen, no puede ser fácilmente determinada, ya que no es claro si sus descendientes formarán parte del cilindro central o del córtex. En algunos casos no se encuentra un grupo indeterminado de células entre ambas regiones y el cilindro central forma un continuo con la primera hilera de la columela; en estos casos, el promeristemo comprende a esta primera hilera y a las células inmediatamente adyacentes del córtex y el cilindro central.

60 y 72 h según el experimento realizado) contando desde la emergencia de la radícula por la testa, debido a la variación natural entre individuos no fue posible analizar estos grupos como etapas distintas y progresivas del

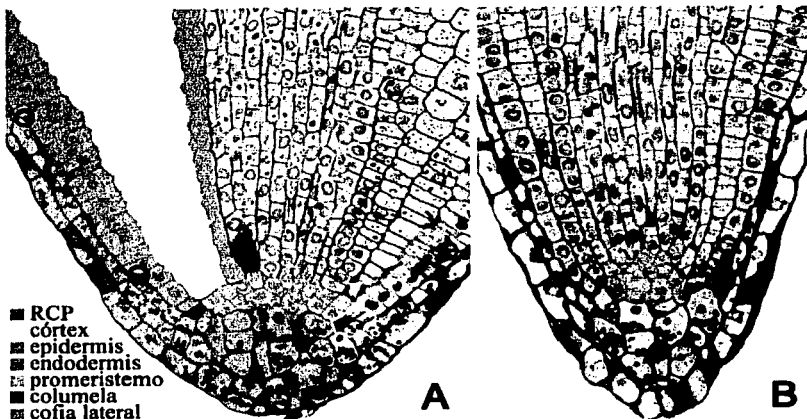
desarrollo. Entonces, se analizaron y clasificaron con base en los cambios morfológicos observados: La forma general del ápice de la raíz, la proximidad de los pelos radicales a la punta y la presencia de células con capacidad proliferativa (tamaño del meristemo), el número de capas que forman el córtex y la cofia lateral, el estado de la columela (número de hileras que la componen y grado de elongación de sus células) así como la orientación de las filas celulares. Con estos criterios morfo-anatómicos se dividió todo el período de crecimiento en tres etapas que resumen los cambios importantes que ocurren durante el desarrollo de la raíz.

Stenocereus gummosus

Etapas 1 (Fig. 3A, B). Radialmente, los tejidos del ápice de la raíz están formados por: Epidermis, tres o cuatro filas de córtex, una capa de endodermis, tejidos provasculares y la cofia. Las filas celulares están curvadas hacia el centro en sus extremos apicales, convergiendo en una pequeña zona equivalente, en posición, al promeristemo. Esta disposición de las filas y la imposibilidad de identificar con claridad la frontera entre columela y meristemo nos indica que la organización del meristemo apical de la raíz primaria de *S. gummosus* es de tipo abierto,

según la clasificación de Guttenberg (referido en Clowes, 1976, 1981). La forma exterior del ápice en el corte medio asemeja una parábola muy abierta, indicando que el incremento en grosor del ápice hacia la zona proximal es muy pronunciado, resultado de varias divisiones tipo "T inversas" (\perp) las cuales deben ser consideradas como preformadas durante la embriogénesis, ya que se les puede reconocer desde antes del inicio de la proliferación celular durante la germinación. La cofia está constituida por una región central (columela) y una porción lateral. La columela mostró estar formada por un máximo de 5 hileras y la cofia lateral por hasta tres capas celulares a nivel del promeristemo. Las células de la cofia presentaron gránulos de almidón cuyo tamaño es mayor al de aquellos que en algunos casos se observaron también en el córtex (Fig. 3B). El aumento distal en el número de capas que constituyen la cofia lateral en esta porción es el resultado de divisiones tipo "T". Estas divisiones también están implicadas en las divisiones de células RCP (iniciales de protodermis - cofia lateral). En algunas raíces observamos células hijas de RCP de reciente formación juzgando por el grosor de las paredes (Fig. 3A y 4A) pero ninguna figura mitótica fue encontrada en ellas por lo que se concluyó que en el desarrollo post

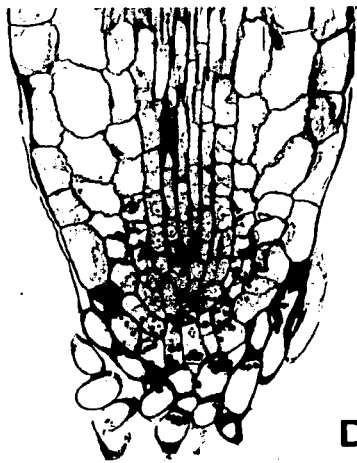
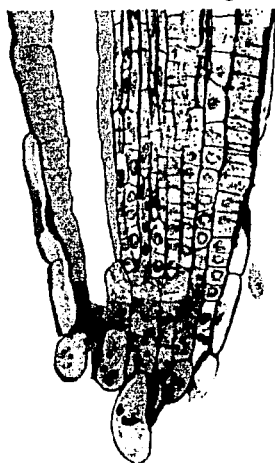
Fig 3 (página siguiente). Secuencia del desarrollo radical de *S. gummosus* mostrando por pares las etapas 1 (A-B), 2 (C-D) y 3 (E-F) Se indican con colores los diferentes tejidos del ápice al inicio de cada etapa y el promeristemo en todas las imágenes. División en T de una célula RCP (cabeza de flecha en A) formando epidermis y cofia lateral, al tiempo que reestablece una nueva RCP (célula roja) cada uno de estos eventos de división deja una marca en forma de T entre la epidermis y la cofia lateral (círculos negros en A) lo cual se considera un indicador de los procesos morfogenéticos dentro del meristemo. En la segunda etapa (C, D) el córtex se ha reducido a dos capas en lugar de tres y la cofia está ausente o muy deteriorada. En la tercera etapa (E, F) los procesos de diferenciación (elongación celular y formación de pelos radicales) terminan por cubrir el ápice ante el agotamiento del meristemo. Se puede observar la formación de un pelo radical por una célula del córtex (flecha negra en F). Micrografía de campo claro 40X. Tinción: Feulgen-PAS y azul de toluidina. Barra = 50 μ m.



- RCP
- córtex
- epidermis
- endodermis
- promeristemo
- columela
- cofia lateral

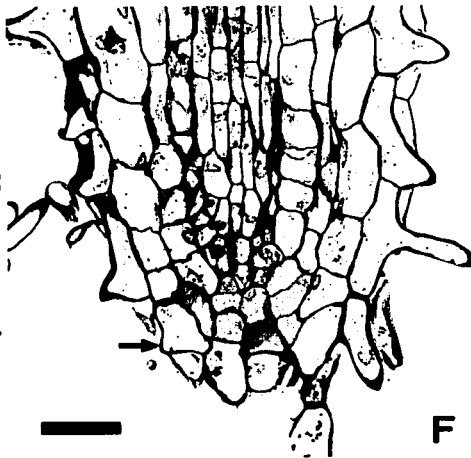
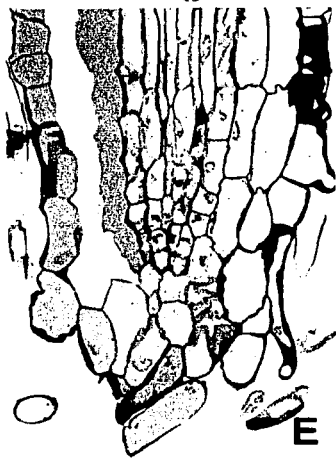
A

B



C

D



O

E

F



10A

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

embrionario de estas raíces la morfogénesis continúa aunque de forma limitada. Considerando las divisiones T de células epidérmicas como un indicador de los procesos morfogenéticos, el número máximo de divisiones de este tipo en la epidermis de uno u otro costado de cada corte, promedió 1.69 por raíz (n=16, Tabla 1).

Etapas 2. (Fig. 3C, D) El meristemo se adelgaza en su porción basal en comparación con las raíces en la etapa anterior. El número de filas de córtex disminuye a tres o dos en la mayoría de las raíces a nivel del ápice. La columela también sufre una reducción en el número de hileras que la componen posiblemente como resultado de la pérdida de células en su periferia, las raíces en esta etapa poseen columelas con tres hileras cuyas células muestran una tendencia a aumentar su

tamaño en el eje longitudinal (Fig. 5A) que sin embargo resultó no significativa bajo una prueba de *t* de Student. Tampoco hubo variación en la cuenta de gránulos de almidón entre ambas etapas (Fig. 5A). El promeristemo mostró un aumento de tamaño en dirección longitudinal (Fig. 5B, C) entre las etapas uno y dos, debido a un incremento, en el mismo sentido, del 30% en las células que lo componen ($P < 0.01$, Prueba de *t*), mientras que su longitud en el eje transversal mostró una reducción significativa entre la segunda y tercera etapas. En la cofia lateral y la epidermis se pueden observar patrones de divisiones tipo T con menor frecuencia que en la etapa anterior promediando 0.82 por raíz (n=22, tabla 1). Las células de los tejidos del cuerpo de la raíz, que limitan a las filas en su extremo distal presentan pequeños gránulos de almidón, más conspicuos en el córtex. El tamaño del meristemo (que puede expresarse en el número de células que contiene una fila hasta donde inicia la elongación), comienza su reducción durante esta etapa. La dinámica de esta reducción ha sido analizada previamente (Dubrovsky, 1997 a, b) y se le ha relacionado con una limitada actividad proliferativa de las células meristemáticas que sólo alcanzan a completar de tres a cinco ciclos celulares antes de abandonar el meristemo. Las formas de los ápices se hacen menos convexas y más elongadas debido a que las filas de células en endodermis, córtex y epidermis, se alejan de la forma paraboloides característica de la etapa

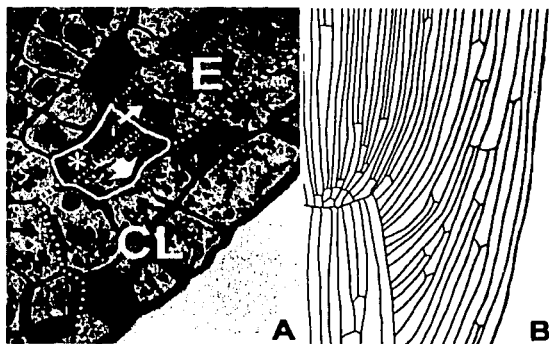


Fig 4. Patrones morfogenéticos. Detalle del ápice de *S. gummosus* (A) mostrando, enmarcadas, las células descendientes inmediatas de una célula RCP (*, *root cap-protoderm initial*). Una división periclinal aporta nuevas células a la cofia lateral (flecha grande) aumentando su grosor de dos a tres capas. Posteriormente, una división anticlinal, genera una nueva célula inicial para la epidermis (i, flecha pequeña) al tiempo que se reestablece la RCP. Distribución de divisiones T y L en un meristemo cerrado (B), compensando el crecimiento diferencial de las distintas regiones del ápice. E = epidermis, CL = cofia lateral. (B, tomado de Clowes, 1961).

Tabla 1 Indicadores morfogénéticos (Div. T / raíz)

Etapa	<i>S. gummosus</i>	<i>P. pringlei</i>
1	1.69 ± 0.6 ^a	N.A.
2	0.82 ± 0.5 ^b	0.89 ± 0.78
3	0.36 ± 0.49 ^c	0.5 ± 0.53

Medias ± DS del número máximo de divisiones T encontradas de un solo lado del corte, para las tres etapas de *S. gummosus* (n = 16, 22, 14) y las dos de *P. pringlei* (n = 9, 8).

anterior y se proyectan rectas en dirección acropétala.

Etapa 3 (Fig. 3E, F). El agotamiento del meristemo se caracteriza por la aproximación de las zonas de elongación y diferenciación celular al ápice de la raíz y la reducción hasta la desaparición de la zona de proliferación. Durante esta etapa se da una desorganización aparente del meristemo causada por la expansión longitudinal y radial de las células, lo cual dificulta la determinación de los promeristemos. Tras su agotamiento las

células siguen diferenciándose hasta el punto en que el ápice se ve cubierto por pelos radicales (Fig. 3F), lo que aun no se ha perdido de la cofia por el desprendimiento de células durante el desarrollo, muchas veces es desplazado o expulsado por los pelos radicales en crecimiento, de tal forma que en esta etapa es poco común observar raíces con cofia. En la región más distal del cilindro vascular se observan la únicas células que mantienen un citoplasma denso y que parecen no ser afectadas por el proceso de elongación (características de células meristemáticas), esto se debe tal vez a la presión que ejercen las células en elongación de los tejidos aledaños. El córtex se ve reducido a una sola capa de grosor. La endodermis presenta en sus células más distales, divisiones tipo ⊥ que aumentan su grosor en dirección apical (Fig. 6C) y que responden a

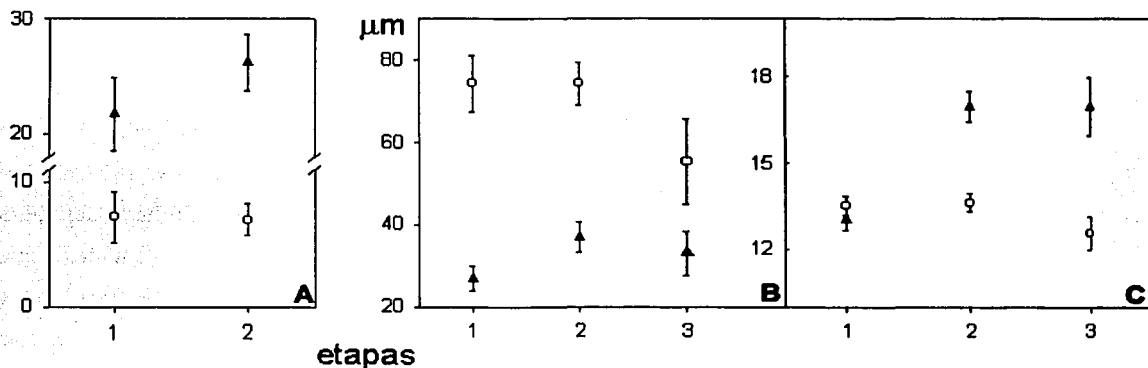


Fig.5 Datos morfológicos de la columela (A) y del promeristemo (B, C) para *S. gummosus*. A: mediciones longitudinales de células de la columela (▲) y cuenta de gránulos de almidón (○) no se considera la tercera etapa por que en ella muchas raíces tienen la cofia muy dañada o fue desprendida; n = 16 y 22 para las etapas primera y segunda. B y C: medidas del promeristemo en conjunto (B) y de sus células (C) en los ejes longitudinal (▲) y transversal (○); el aumento significativo que experimentó el promeristemo en dirección longitudinal, entre las etapas 1 y 2 (B) se explica por el crecimiento de sus células en el mismo sentido (C) y no por un aumento en el número de estas; lo mismo se puede decir de la reducción en el sentido transversal que se observa entre las etapas 2 y 3. El resto de las comparaciones realizadas no mostraron diferencias significativas. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para las muestras analizadas.

Fig 6. *S. gummosus*. Detalles morfológicos del meristemo en agotamiento (A-C) y mitosis dentro del promeristemo (D). Formación de pelos radicales por células del cortex (cabezas de flecha en A y B) en la región apical donde la epidermis está dañada o se ha desprendido. Una división periclinal, poco frecuente en la endodermis (flecha blanca en C), parece compensar las tensiones generadas durante el agotamiento del meristemo. La presencia de núcleos en telofase (* en D) dentro del promeristemo de una raíz joven, muestra que la actividad proliferativa en esa zona no se encuentra reprimida.



tensiones generadas en el ápice por el agotamiento del meristemo. La presencia de divisiones T en el complejo epidermis-cofia lateral se reduce a 0.36 por raíz ($n=14$, tabla 1). La epidermis se diferencia; así lo indican los pelos radicales que se encuentran cubriendo todo el ápice o la mayor parte de este en diferentes raíces. Se observó también, la formación de pelos radicales por células del córtex en 4 de 15 raíces (Fig. 6A, B). Estas células en el extremo distal de la fila del córtex, estaban expuestas en la superficie del ápice debido al desprendimiento de la epidermis en ese punto, ocupando así una posición superficial en el ápice, lo que puede explicar el cambio en el desarrollo de estas células que normalmente no forman pelos radicales, pues es sabido (Van den Berg et al., 1995) que la información posicional puede en muchos casos determinar la identidad de las células independientemente del origen histológico que estas tengan. En la etapa cuando el

meristemo se ha agotado completamente (presencia de pelos radicales hasta la punta de la raíz) las células de todos los tejidos presentes continúan vivas según lo sugiere la apariencia de los núcleos.

Pachycereus pringlei.

Los cambios ontogenéticos en *P. pringlei* y la organización del meristemo apical son similares a los de *S. gummosus*. El período total de crecimiento dura alrededor de 8 días (Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). Para tener la seguridad de que se iban a observar raíces en segunda etapa, se obtuvo la dinámica de crecimiento para 12 plántulas durante seis días (Fig. 1). La etapa 1 es relativamente corta pues un día después de la emergencia de la radícula, las raíces ya tenían las características de la segunda etapa, la cual tiene una duración de 5 o 6 días. El meristemo también es de tipo abierto y la cofia -relativamente grande- está compuesta por 6 o 7 hileras, esta característica se mantuvo constante a

lo largo de esta etapa lo que sugiere que las células iniciales para este tejido funcionan normalmente durante este período. La cofia lateral es relativamente pequeña, pues el número de capas que la componen no es mayor que tres igual que en *S. gummosus*. En contraste, las células RCP aparentemente no están activas pues en promedio sólo se encontraron 0.9 divisiones T dentro del complejo epidermis-cofia lateral, por raíz en esta etapa (tabla 1). Los cambios morfológicos durante la tercera etapa muestran el mismo patrón que para *S. gummosus*: expansión y diferenciación de las células apicales, formación de pelos radicales en ápice, decremento en el tamaño y pérdida subsecuente de la cofia.

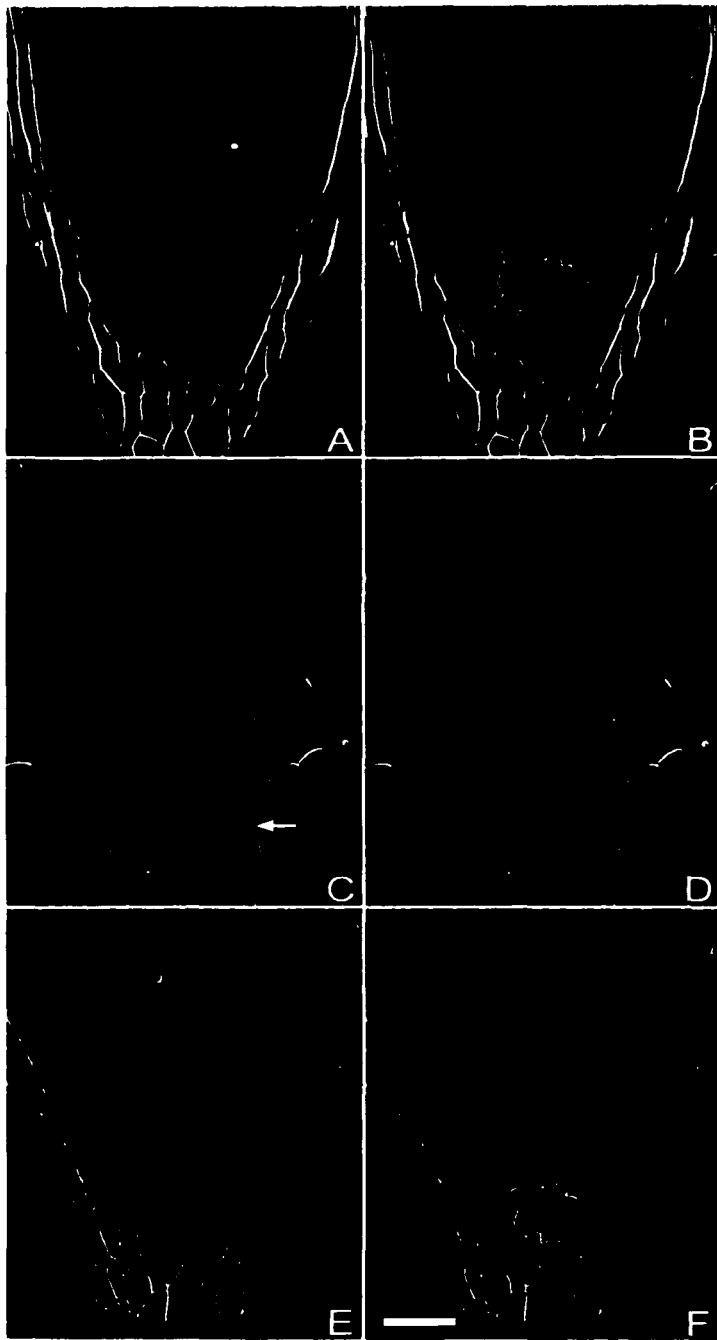
Análisis de la proliferación celular en el meristemo apical

Figuras mitóticas. El análisis detallado de figuras mitóticas se realizó en cortes de *S. gummosus*. Los resultados muestran que el índice mitótico incrementó 1.5 veces entre la primera y segunda etapas mientras que entre la segunda y la tercera mostró una disminución de 2.1 veces ($P < 0.05$ y $P < 0.001$, respectivamente, en pruebas *t* de Student, tabla). En las raíces más avanzadas de

la etapa tres no fueron encontradas figuras mitóticas. Los índices mitóticos en el promeristemo, fueron significativamente similares ($P < 0.05$, Fig. 8) a los del resto del meristemo para todas las etapas. No obstante, solamente se encontraron núcleos en mitosis, dentro del promeristemo, en 50, 44 y 11% de las raíces en las etapas uno, dos y tres, respectivamente (con $n = 12, 16$ y 9). Esto explica la gran dispersión que existe en los datos para el promeristemo (expresada por amplios intervalos de error alrededor de las barras en la figura 8) pues el reducido número de células que lo componen -que va de 7 a 17 en las tres etapas-, por un lado disminuye la probabilidad de encontrar núcleos en mitosis dentro de la pequeña zona, y por otro, cuando se les encuentra, éstos representan un alto porcentaje del total de núcleos presentes en el promeristemo (tabla 2)

La distribución de figuras mitóticas a lo largo del meristemo (Fig. 8B) muestra que existe una distancia a partir de la frontera cofia-cilindro central en la cual sucede la mayor parte de los eventos mitóticos. Esta distancia es una medida relativa pues para cuantificarla no se utilizan unidades de distancia sino el número de células entre la figura mitótica y el inicio de la fila donde

Fig 7 (página siguiente). Análisis de la proliferación celular en los meristemas de *P. pringlei* en etapa dos (A, B) y de *S. gummosus* en las etapas segunda (E, F) y tercera (C, D). Imágenes de iluminación mixta con campo claro y epifluorescencia para DAPI (A, C y E). A la derecha de cada una se han montado sobre la misma imagen, los núcleos marcados con BrdU (en verde), tomados de una imagen de epifluorescencia con FITC del mismo corte (B, D y F). La raíz de *P. pringlei* muestra la presencia de un centro quiescente, como una zona carente de marca que coincide con el promeristemo encerrado en amarillo (B). La raíz de *S. gummosus* en la misma etapa (F) muestra suficiente marca dentro del promeristemo como para descartar la presencia de un centro quiescente, mientras que en otra raíz de la misma especie, en etapa terminal del crecimiento (C, D) ni siquiera es posible definir los límites del promeristemo por la desorganización del propio meristemo. La flecha en E, señala un pelo radical. Barra = 50 μ m.



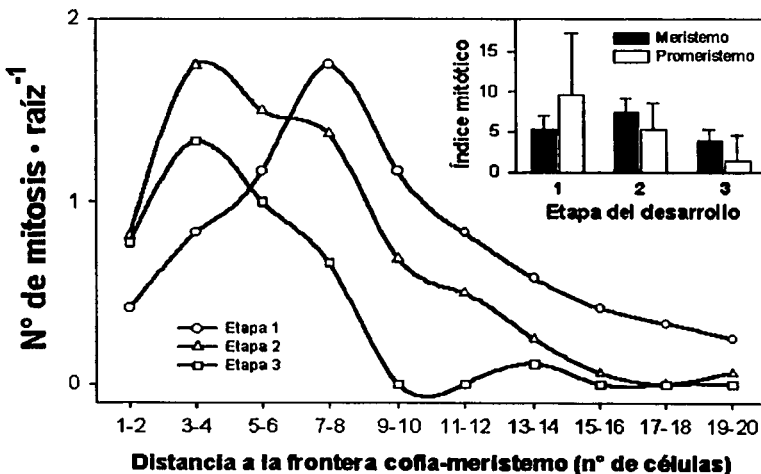
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

esta se encuentra. En las raíces en etapas 1 y 2, fue posible encontrar figuras mitóticas hasta una altura de 19 células y el mayor número de estos eventos tuvo lugar a una altura entre la séptima y octava células, para la etapa 1 y entre la tercera y cuarta para la etapa 2. La máxima altura a la cual se encontró una figura mitótica para la etapa 3 fue alrededor de la décima posición dentro de la fila y su máximo se ubicó entre las posiciones tercera y cuarta. (Fig. 8). Por lo tanto, la región de máxima actividad proliferativa, se desplaza hacia el ápice cuando la raíz pasa de la primera etapa a la segunda y de ésta a la tercera, reflejando de este modo la reducción del meristemo durante el período de desarrollo. Se elaboraron dos formas de visualizar estos datos, (1) considerando el promedio de mitosis encontradas en cada altura para las raíces en una etapa en particular (Fig. 8) o (2) estimando qué porcentaje del total de

mitosis encontradas en una etapa, representan las mitosis encontradas para cada altura en particular (no mostrada) ambas formas muestran el desplazamiento hacia el ápice de la zona de máxima proliferación, sin embargo se escogió la primera gráfica por ser una representación más directa de los datos y por reflejar mejor el descenso en la proliferación característico de la tercera etapa.

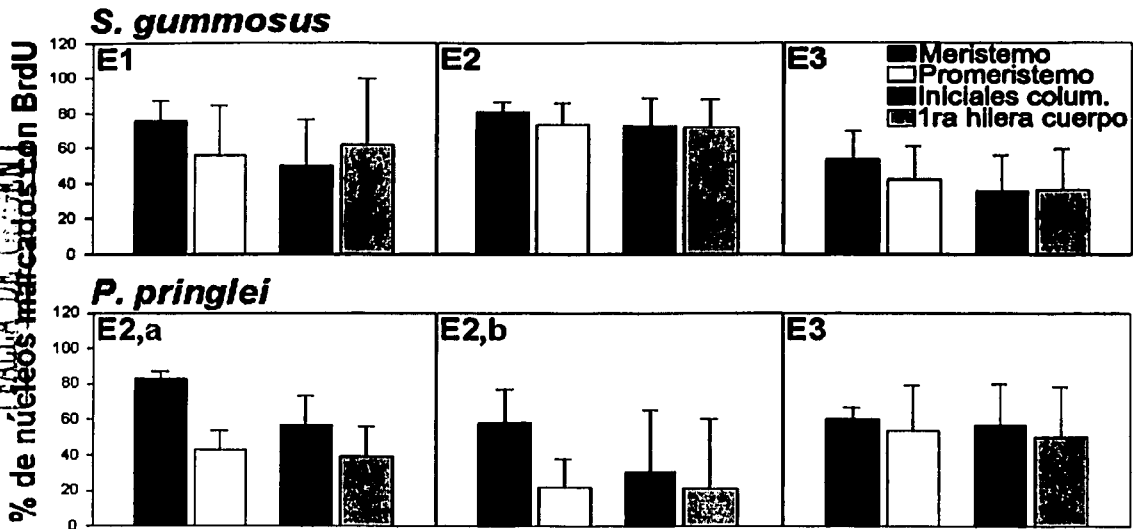
Inmunohistoquímica. En experimentos preliminares, cortes histológicos del material fijado con glutaraldehído (solución fijadora 1, en métodos) mostraron un grado muy alto de autofluorescencia bajo la iluminación para FITC interfiriendo con la correcta apreciación de los núcleos marcados, por lo que se adoptó para el resto de los experimentos la solución de paraformaldehído al 2% en buffer de fosfatos 0.1 M.

Fig 8. Distribución de figuras mitóticas a lo largo del meristemo radical de *S. gummosus* (figura principal) y cuenta total del Índice mitótico dentro y fuera del promeristemo (figura barras), para las tres etapas del desarrollo. La gráfica con líneas muestra el corrimiento hacia el ápice, durante el desarrollo, del punto de mayor actividad mitótica. Los datos reflejan el promedio de mitosis encontradas para cada distancia desde la cofia en dirección basal. La distancia está dada en el número de células que contiene una fila desde que inicia, en la frontera con la cofia o el promeristemo, hasta la figura mitótica encontrada. La gráfica de barras muestra un descenso general en la actividad mitótica de la primera a la tercera etapa. La tendencia que muestra una menor actividad del promeristemo respecto al meristemo, fue anulada bajo una prueba de T de Student para las tres etapas.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
 FALTA DE CUBRIR
 MARCAJE CON BrdU



Los datos de marcaje con BrdU y su posterior detección con anticuerpos (Fig. 7 y 10) hablan del porcentaje de células que atraviesan la fase S del ciclo celular durante el período de incubación que en este caso es principalmente de 24 h aunque también se realizaron experimentos con 48 y 72 h de incubación. Los porcentajes se obtuvieron dentro de la región que fue considerada el tamaño del mínimo de un meristemo en primera o segunda etapa de una muestra de raíces de ambas especies. Esta región, midiendo desde la frontera distal del promeristemo, equivale a 120 μm y 175 μm en *S. gummosus* y *P. pringlei*, respectivamente. La duración del ciclo celular en estas especies ha sido analizada previamente por dos métodos independientes y corresponde en promedio a 12.1 h para *S. gummosus* y 16.9 h para *P. pringlei* a 29°C (Dubrovsky et al., 1998).

Considerando esto, las medias del porcentaje de marca para las tres etapas en *S. gummosus* (75.9, 80.4 y 72.1, respectivamente, sin contar los promeristemos, Fig. 10) resultaron más bajas de lo esperado, pues el tiempo de incubación de los experimentos principales fue de 24 h —el doble de la duración del ciclo celular—. Las posibles causas de esto son analizadas en la discusión. Las raíces incubadas por 48 h promediaron 89.1% (± 2.8 DS, $n=4$) de células marcadas en el meristemo, excluyendo al promeristemo. Aquellas que fueron incubadas por 72 h, tuvieron que ser descartadas debido a que presentaron un daño severo en los núcleos, los cuales bajo tinción de DAPI, se mostraban como relictos sumamente reducidos. La causa de esto fue, con gran seguridad, la prolongada exposición a la Bromo-desoxi-Uridina. En *P. pringlei* las medias del porcentaje

LABORATORIO
 FALTA DE ORIGEN

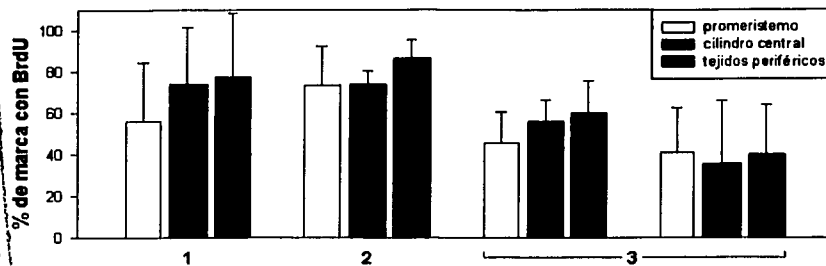


Fig 10. Porcentaje de células de tres zonas de la raíz (promeristemo, cilindro central y tejidos periféricos), de *S. gummosus*, que atravesaron la fase S durante el periodo de 24 h de incubación en BrdU. Datos para las tres etapas del desarrollo. La tercera etapa fue separada entre meristemos en agotamiento (izquierda) y aquellos totalmente agotados (derecha).

Fig 9 (página anterior). Datos del porcentaje de células que atravesaron la fase S durante 24 h de incubación en BrdU, para tres etapas de *S. gummosus* y *P. pringlei*. Se compara el % de marca entre el promeristemo y el resto del meristemo, así como entre la primera hilera del cuerpo, adyacente a la columela, y las iniciales de ésta; el fin de la segunda comparación es contar con un criterio independiente de la definición de promeristemo, para la identificación de poblaciones celulares diferenciables por su capacidad proliferativa. En *S. gummosus* no se encontró ninguna diferencia entre las zonas comparadas, lo que indica la ausencia de un centro quiescente o una población celular con tasas de proliferación significativamente menores al resto del meristemo. En *P. pringlei* la comparación de los % de marca entre el promeristemo y el meristemo de raíces al inicio y al final de la segunda etapa sí mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$ y $P < 0.004$, respectivamente; prueba T de Student) señalando así el establecimiento temporal de un centro quiescente dentro de estas raíces. En la tercera etapa estas diferencias desaparecen y por lo tanto el centro quiescente también. Barras de error = intervalo de 95% de confianza alrededor de la media.

de marca fueron de 80.7 y 55.5 para las etapas 1 y 2 ($n = 10$ y 9, respectivamente)

Para probar la hipótesis de que en la tercera etapa el tejido provascular se mantiene más activos que el resto de los tejidos dentro del meristemo agotado, por el papel que aquel tiene que desempeñar en la conducción de agua y solutos, se consideraron por separado los porcentajes de marca del cilindro central (provascular) y del complejo endodermis-córtex-epidermis para las tres etapas del desarrollo de *S. gummosus*. Los resultados (Fig. 10) mostraron que no hay diferencias entre los compartimentos analizados respecto a la incorporación de BrdU durante las tres etapas del desarrollo, indicando que las células del córtex mantienen su capacidad de síntesis de DNA hasta la última etapa; sin embargo la tercera etapa, al estar compuesta tanto de raíces con meristemos ya exhaustos, como de

aquellas con meristemos en proceso de agotamiento, presenta más heterogeneidad respecto a las otras dos. Las observaciones sugirieron separar y considerar para el mismo análisis, sólo meristemos totalmente agotados, es decir, los de aquellas raíces en la etapa tres con pelos hasta el extremo distal del ápice. En este caso los porcentajes de marca tampoco variaron (P) entre los compartimentos pese a que entre estas últimas raíces ($n = 7$) se encontraron núcleos marcados principalmente en el cilindro central. Por otro lado el gran tamaño de estos núcleos marcados dentro de los meristemos exhaustos (Fig. 7C) indica o al menos sugiere la presencia de procesos de endo-reduplicación.

Centro quiescente. *S. gummosus*. Al observar los cortes de raíces de que han sido tratados con anticuerpos, no puede apreciarse en esta especie, una zona compacta, definida y sin marca (Fig. 7E,

F) es decir, que un primer análisis cualitativo de estas raíces, indica la ausencia de un centro quiescente en las raíces de cualquier etapa del desarrollo para esta especie. El análisis cuantitativo mostró que esta apreciación es adecuada. Los porcentajes de células que atravesaron la fase S durante el período de incubación fueron similares entre el promeristemo y el resto del meristemo de raíces en la primera ($P = 0.11$, $n = 5$) segunda ($P = 0.28$, $n = 10$) y tercera ($P = 0.22$, $n = 5$) etapas (tabla 1 y Fig. 9) También se comparó el porcentaje de marca de la primera hilera de la cofia -que normalmente comprendió a las células más distales del promeristemo-, con el porcentaje de las células adyacentes a esta hilera en dirección basal ya que las primeras debieran estar más activas es caso de haber centro quiescente ya que son iniciales y las segundas normalmente forman parte del centro quiescente. Aquí tampoco hubo diferencias para ninguna de las etapas.

P. pringlei. En esta especie, la situación fue distinta, una vez definidos los promeristemas se observaron las raíces con la marca y se encontró que en 8 de 14 sí se puede distinguir una zona compacta sin marca en ápice (Fig. 7A, B). Debido a que en esta especie la segunda etapa es bastante más larga, hubo que dividirla en dos grupos: 2a y 2b. Se aplicaron los mismos criterios morfológicos que utilizados para separar las raíces de *S. gummosus* en tres grupos; de modo que se les puede llamar etapa dos, etapa dos-tardía y etapa tres (2a, 2b y 3, respectivamente, Fig. 9). Igual que para *S. gummosus* los promeristemas se definieron independientemente del patrón de marcaje, en cortes sin la marca de FITC sobre puesta; en las raíces con zonas en el ápice claramente carentes de marca, éstas coincidieron con los límites del promeristemo. Lo anterior solamente representa un análisis cualitativo de la situación, sin embargo el análisis cuantitativo mostró resultados similares: Los

Tabla 2 Proliferación celular en *Stenocereus gummosus*. Porcentaje de marca con BrdU y fracción mitótica (%M)

Porción del ápice (% BrdU)		Etapa 1 (n=5)		Etapa 2 (n=18)		Etapa 3 (n=12, (7))	
		Media	± 95% conf.	Media	± 95% conf.	Media	± 95% conf.
Meristemo	Total	75.9	11.6	78.7	4.7	60.9 (42.2)	12.7 (21.1)
	E.C.E	77.7	31.0	86.8	8.8	60.2 (40.2)	15.5 (23.9)
	Cilindro central	74.2	27.3	74.0	6.5	56.2 (35.3)	10.6 (30.9)
Promeristemo		56.3	28.2	73.8	18.6	45.3 (26.5)	15.1 (28.6)
Hilera más distal del cuerpo		62.0	37.7	72.2	16.1	73.3	22.4
Primera hilera de la columella		50.0	26.4	72.5	16.4	62.0	15.6
%M - Meristemo		5.3	1.7	7.5	1.7	3.8	1.4
%M - Promeristemo		9.6	7.6	5.3	3.3	1.4	3.2

datos numéricos indicaron diferencias significativas entre los porcentajes de marca del promeristemo y del resto del meristemo en las raíces de la etapas segunda y segunda-tardía (tabla 3, Fig. 9). En la tercera etapa la variación en los porcentajes de marca dentro de los promeristemos, fue muy elevada y la misma prueba de t mostró que las diferencias de marcaje entre las dos zonas no son significativas ($P = 0.8$, $n = 9$; Fig. 9) El análisis del límite cofia-meristemo no mostró como se esperaba (dado la

baja actividad proliferativa dentro de los promeristemos) una mayor actividad en las células iniciales de la columela que en las más distales del cuerpo únicamente en el grupo más joven analizado (segunda etapa) apareció un tendencia en este sentido pero las diferencias se anulaban bajo la prueba estadística ($P=0.07$, Fig. 9) en los otros dos grupos la variabilidad de los datos fue muy amplia y no se detectaron diferencias entre uno y otro lado de éste límite.

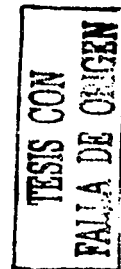
DISCUSIÓN

Los conceptos de meristemo abierto y meristemo cerrado fueron introducidos por Guttenberg (referido en Clowes, 1976, 1981) y se refieren a la presencia de un grupo de células iniciales, compartido o independiente para la cofia y el cilindro central. En algunos casos de meristemos abiertos, la zona compartida incluye también a las iniciales del córtex (Clowes, 1981).

Este también es el caso de las dos especies de cactáceas aquí estudiadas. En *S. gummosus*, los procesos morfogenéticos son limitados, ya que el número de divisiones T en la epidermis mostró una reducción progresiva de la etapa uno a la tres y porque no se encontraron divisiones formativas anticlinales o periclinales en las células identificadas como RCP. Lo mismo puede

Tabla 3 Proliferación celular en *Pachycereus pringlei*. Porcentaje de marca con BrdU.

Porción del ápice (% BrdU)	Etapa 2 (n=14)		Etapa 3 (n=9)	
	Media	± 95% c.	Media	± 95% c.
Meristemo Total	80.7	2.8	55.5	6.4
E.C.E	82.0	3.2	60.3	9.2
Cilindro central	79.0	5.2	49.7	9.0
Promeristemo	30.1	7.8	33.6	27.0
Hilera más distal del cuerpo	38.4	16.7	33.3	34.5
Primera hilera de la columella	56.0	16.6	41.9	28.8



decirse del meristemo apical de *P. pringlei*.

La estructura modular que se encontró en la cofia lateral y la presencia de divisiones T en este tejido, confirman la existencia de características fundamentales comunes a los meristemos abiertos y cerrados (Wenzel et al., 2001). La reducción general en el grosor de la raíz en ambas especies, indica también la baja actividad de las células iniciales. Sin embargo, los procesos morfogénéticos no se suspendieron totalmente después de la germinación. La formación de pelos radicales por parte de algunas células del córtex, en el extremo distal de la raíz, indica que la identidad epidérmica no se encuentra reprimida y que la posición superficial de estas células -que han quedado expuestas por el desprendimiento de la epidermis en la tercera etapa- pudo haber determinado su diferenciación a un estado epidérmico, aunque provengan de un linaje distinto. La importancia que puede tener la información posicional para determinar la diferenciación, desdiferenciación o rediferenciación de células por encima del origen que estas tengan, ha sido confirmada muchas veces con anterioridad (Jürgens, 1995; van den Berg et al., 1995, 1997, 1998; Scheres, 1997) y la comunicación celular juega un papel muy importante en este proceso (Fig. 14, Apéndice II). En *S. gummosus*, el aumento de tamaño que experimentó el promeristemo en su eje longitudinal entre la primera y segunda etapas, así como la reducción en el eje transversal entre la

segunda y la tercera, quedaron explicados por los cambios de tamaño de las células que lo componen al darse estos en las mismas direcciones y durante los mismos intervalos (Fig. 5 B, C).

El índice de marcaje con FITC en las especies estudiadas, fue de alrededor del 80% para 24 h de incubación. En teoría, todas las células en el meristemo proliferan (Ivanov, 1981) y en estas especies los tiempos de duplicación celular -en etapa estacionaria de crecimiento- duran considerablemente menos de 24 h, (Dubrovsky et al., 1998). por lo que se esperaría que el porcentaje de marca en el meristemo, fuera cercano al 100%. Si asumimos que todas las células tienen ciclos de igual duración, es posible entonces, que al incubar las raíces de la etapa 1, no todas las células hayan empezado su ciclo pues se sabe que durante las primeras etapas de la germinación la raíz crece principalmente por la expansión celular consecuencia de la rehidratación, antes de reactivarse el ciclo celular. Es igualmente posible que algunas células hayan abandonado su ciclo antes de iniciar el período de incubación, para aquellas raíces en la segunda etapa de desarrollo. También se a mostrado anteriormente que existe heterogeneidad entre individuos en la duración del crecimiento de la raíz y que algunas plantas dejan de crecer antes que otras teniendo sólo 25% y 53% del promedio de la longitud final de la raíz en *S. gummosus* (Dubrovsky 1997b) y *P. pringlei* (Dubrovsky y

Gómez-Lomelí, 2003) respectivamente. Al inicio de los experimentos de incorporación de BrdU no era posible saber cuándo una planta individual iba a terminar su crecimiento. Esto puede explicar parcialmente el hecho de haber encontrado menos del 100% de marca con FITC dentro del meristemo. Tampoco se puede excluir la posibilidad de que -al contrario de lo que sucede en las raíces con crecimiento indeterminado-, la duración del ciclo celular en raíces con crecimiento determinado no sea igual en todas las células y pueda alargarse durante el agotamiento del meristemo, sobre todo en la zona proximal del mismo. Una última posibilidad es que la concentración utilizada de BrdU no haya sido suficientemente alta, esto es poco probable pues el protocolo ha sido ensayado muchas veces en múltiples laboratorios, sin embargo, nunca con cactáceas, cuyos tejidos podrían presentar mayor resistencia a la penetración de la sustancia, como fue el caso del yoduro de propidio para microscopía confocal que se pretendió utilizar en este mismo trabajo. Probar estas hipótesis o cualquiera de ellas, representa por lo menos, un año más de trabajo experimental, fuera del alcance de esta tesis.

La cuenta del porcentaje de marca por tejidos (cilindro central vs. Complejo endodermis-córtex-epidermis) mostró que durante la tercera etapa, fuera del cilindro central se mantiene una mayor actividad de síntesis de DNA que dentro de él (Fig. 10) La menor actividad del

cilindro central puede estar relacionada con la diferenciación y posterior muerte de sus células lo cual es requerido para el transporte de agua y solutos por el metaxilema. Sin embargo la conclusión más importante sobre este punto, es que la raíz se mantiene con vida después del agotamiento meristemático.

La similitud entre los índices mitóticos del meristemo y el promeristemo de *S. gummosus* así como entre los porcentajes de incorporación de BrdU en ambas zonas, indican que el centro quiescente no se estableció en estas raíces. Se encontraron algunas figuras mitóticas dentro del promeristemo (Fig. 6D) lo que confirma la presencia de actividad proliferativa en esa zona. Estas divisiones en apariencia no son formativas y en general los procesos morfogénicos se mostraron muy limitados. Ninguna población celular compacta con ciclos celulares de mayor duración, se pudo identificar.

En las raíces de *P. pringlei*, los análisis cualitativos y cuantitativos indicaron el establecimiento temporal de un CQ en sus ápices. En aquellos casos cuando cualitativamente se detectó un centro quiescente como una zona compacta no marcada con FITC, (Fig. 7B) esta zona coincidió con el promeristemo definido previamente para esa raíz. Esto indica que el criterio que se utilizó para definir los promeristematos, fue acertado. El carácter temporal del CQ en esta especie se ve reflejado en hecho de que 43% de las raíces en la etapa dos no

mostraron, por simple observación, un CQ claramente definido, a pesar de que la comparación cuantitativa de los porcentajes de marca mostró claras diferencias dentro y fuera del promeristemo (Tabla 2) Con base en la duración del crecimiento de la raíz, en el tiempo de duplicación celular y en el número de células en el meristemo, se predijo (Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003) que la actividad de las células iniciales es requerida para el mantenimiento temporal del meristemo que se ha observado en *P. pringlei*. El establecimiento del centro quiescente durante el crecimiento sostenido de estas raíces confirma esta predicción, pues en tanto se mantenga, el CQ es un indicador del funcionamiento de las células iniciales.

En las plantas en general el CQ se establece en el meristemo apical de la raíz primaria muy pronto después de la germinación (Clowes, 1958) excepto en *Allium cepa*, donde el CQ se establece de células que no proliferan durante la germinación (Bitonti et al., 1992). Estos y otros trabajos (Byrne, 1973; Clowes, 1975) muestran que se requiere una población proliferativamente activa de células meristemáticas para que el CQ se establezca. En *S. gummosus*, durante las primeras dos etapas del desarrollo la actividad proliferativa de las células meristemáticas fue relativamente alta, sin embargo el CQ no se estableció. Se concluye que una alta proliferación en el meristemo es

condición necesaria pero no suficiente para el establecimiento del CQ.

El CQ y la columela son dos tejidos vecinos que interactúan directamente, de hecho las definiciones más recientes de los meristemas cerrados o abiertos indican que la única diferencia real es la tasa de transferencia o aporte de células del CQ hacia la columela (Barlow 1997) siendo esta alta en los meristemas abiertos y baja en los cerrados. También como ya se vio es muy probable que la cofia ejerza un control químico sobre las células del CQ ya que éstas se activan al retirar la cofia. Los datos morfológicos colectados en este trabajo indican que la actividad de este tejido es bastante limitada: No hay un aumento en el número de hileras, las células sólo crecen sin dividirse y los gránulos de almidón no presentan cambios durante el desarrollo.

La naturaleza de la interacción CQ-cofia, permite pensar -para *S. gummosus*- que la corta vida de esta última y la baja actividad de sus células, sean factores involucrados en el no establecimiento del CQ. Estos resultados sugieren trabajos experimentales futuros, sobre la distribución de auxina y ácido ascórbico en la frontera cofia-CQ, a la luz de los más recientes descubrimientos del papel que tienen estos compuestos en la fisiología del desarrollo del ápice (Jiang, 2003) Por lo pronto, una deficiencia de glutatión parece no ser la causante del patrón de crecimiento determinado. Así lo sugieren

experimentos paralelos a este trabajo realizados por miembros de este mismo grupo (Dubrovsky), en los cuales se intentó -sin éxito- cambiar el patrón de crecimiento determinado a indeterminado por la adición al medio de glutatión. Este factor de crecimiento había mostrado la capacidad para devolver el patrón de crecimiento indeterminado a mutantes de tomate *rm11* (Vernoux et al., 2000) en los cuales la proliferación post-germinación se encuentra inhibida por falta de la enzima γ glutamilcisteína sintasa y por ende de glutatión (Cheng et al., 1995).

Desde los primeros experimentos de localización de la síntesis de ácidos nucleicos dentro del meristemo y la formulación del concepto de centro quiescente en angiospermas (Clowes, 1958) hasta nuestros días, el CQ ha sido considerado como el sistema a prueba de fallas, que asegura la reanudación del desarrollo, después de condiciones que han afectado su continuidad (Barlow 1994). La presencia del CQ en gimnospermas y angiospermas indica que su ausencia en algunas cactáceas es un fenómeno evolutivo secundario. Como lo indican los estudios de obliteración celular por rayo láser, el CQ se encarga de mantener el estado indiferenciado de las células que lo rodean (Van Den Berg et al., 1997). Los datos colectados en este trabajo sobre la falta de CQ coinciden con esta noción, ya que todas las células meristemáticas completan su diferenciación. Se

puede entonces afirmar, que el programa de desarrollo determinado de la raíz primaria se estableció durante la evolución de las especies estudiadas y especular que esto sucedió como resultado de la adaptación a ambientes adversos en los cuales el patrón de crecimiento determinado, se adecuó mejor que el de crecimiento indeterminado, a los requerimientos del establecimiento y éxito de las plántulas. El patrón de crecimiento determinado permite la formación de muchas raíces laterales con una gran cantidad de pelos radicales, característica importante para la absorción abundante de agua y minerales y por lo tanto para el establecimiento de las plántulas en condiciones adversas (Boke, 1979; Dubrovsky, 1997; Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). Aquí se estudiaron raíces primarias, pero en las mismas especies algunas raíces laterales crecen por tiempos más largos (Dubrovsky, 1997; Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). Por lo tanto no se puede excluir la posibilidad del establecimiento del CQ por períodos mucho más prolongados.

Las células precursoras del CQ se establecen durante la embriogénesis descendiendo de las células de la hipófisis que a su vez se originan de la célula basal del cigoto (Scherers et al., 1994; Jürgens, 2001) Mutaciones en el gen *HOBBIT* (*HBT*), afectan a los precursores de la hipófisis en tal forma que el CQ no se establece (Willemsen et al., 1998). En *Arabidopsis*, el *HBT* es requerido para la

especificación adecuada de las células meristemáticas iniciales. Un gen ortólogo a *HBT* en estas cactáceas podría explicar la similitud entre el patrón de crecimiento de las mutantes *hobbit* y el de aquellas, pero el crecimiento sostenido de *P. pringlei* al inicio de su desarrollo y la anatomía bien formada de las raíces más jóvenes de *S. gummosus*, sugieren fuertemente que el desarrollo embrionario de estas especies ocurre sin defectos para la célula hipófisis y sus descendientes.

Genes con mayor posibilidad de estar involucrados en el agotamiento meristemático de las raíces de estas cactáceas serían -en caso de ser encontrados- los ortólogos a *SCR*, *Cak-1-At* y *PID* de *Arabidopsis*. El primero, como ya se vio, se requiere para la determinación de las células del CQ; el segundo, codifica para un tipo de enzimas encargadas de activar a casi todas las cinasas dependientes de ciclina, quienes juegan un papel crucial en la regulación del ciclo celular, el cual al ser interrumpido desencadena los procesos de diferenciación (Umeda et al., 2000). Se ha propuesto que *Cak 1 At* regula el estado indeterminado de las células iniciales para garantizar el desarrollo continuo del meristemo. El último de estos factores, el gen *PID (PINOID)* codifica para una cinasa presente en los primordios de cotiledones, hojas y flores, así como en el tejido vascular de órganos en desarrollo y en la proximidad de los meristemas. La sobre expresión de este gen en plántulas de

Arabidopsis, resulta en el colapso del meristemo de la raíz primaria y dispara la formación de raíces laterales (Benjamins et al., 2001) la evidencia indica que el gen regula la organogénesis al incrementar el transporte polar de auxina.

Conclusiones finales. Además describir la organización del meristemo apical de la raíz de las especies estudiadas, y su morfológica con cierto grado de detalle, el presente trabajo muestra en un sistema natural (con especies silvestres) de raíz primaria, como el establecimiento del centro quiescente, va aparejado al crecimiento continuo de la raíz y su ausencia al agotamiento de la misma. Los resultados coinciden con la noción de que el CQ representa una población de tipo células del nicho, esencial para mantener el estado indiferenciado de las células madre o iniciales, encargadas de dirigir el crecimiento y de la organización en tejidos diferentes de los meristemas apicales y las raíces. Su ausencia en las Cactáceas aquí estudiadas, representa, en el nivel celular, la causa del agotamiento meristemático de las raíces primarias. La razón de porqué el CQ no se establece o no prospera en estas raíces -explicación última del patrón de crecimiento determinado- debe buscarse en el nivel molecular de la expresión genética.

También se sugiere fuertemente que un número limitado de ciclos celulares en los meristemas de raíces con crecimiento

indeterminado, implica la existencia de un CQ como fuente primaria de células y componente obligatorio para la organización del crecimiento de las raíces de las plantas.

La condición evolutiva adquirida por estos cactus es tan estable y uniforme dentro de las poblaciones que la presentan, que parece difícil que sea producto del azar; además, por presentarse desde la raíz embrionaria se puede pensar en ella como un programa preestablecido del desarrollo. Sin embargo, como se ha visto, los meristemas pueden perder su capacidad organizativa por la disfunción de cualquiera de varios genes y esto dificulta hablar en términos de adaptación (sobre todo en un trabajo de desarrollo en el que no se hacen estimaciones en campo de este factor evolutivo). Sólo se dirá, que la hipótesis adaptativa, coincide con la ventaja que representa para estas plantas de climas áridos, la posesión de un sistema radicular profuso y compacto de rápida formación, el cual sí es

consecuencia directa del patrón de crecimiento determinado. En este trabajo no se analizó la propia formación de la raíz primaria durante embriogénesis, pero no debe extrañar si durante esta fase del desarrollo se detecta la presencia de un CQ en el ápice de la radícula, pues -como se ha afirmado múltiples veces en la literatura consultada- se necesita un CQ para establecer en el embrión, el patrón de desarrollo que será reproducido por la raíz después de la germinación.

El crecimiento determinado de la raíz primaria de cactáceas bien puede ser un mecanismo celular acoplado evolutivamente al medio ambiente. Esta idea sugiere una interesante línea de investigación que vincule los campos de la biología del desarrollo y la ecología, para explicar hasta qué punto la ontogenia de estas especies ha sido sujeto de la adaptación evolutiva.

REFERENCIAS

- Barlow PW (1976) Towards an Understanding of the Behaviour of Root Meristems. *J Theor Biol* 57: 433-451
- Barlow P.W. (1993) The cell division cycle in relation to root organogenesis. En: *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle* (eds J.C.Ormrod & D.Francis), pp. 179-199. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Barlow PW (1994) Structure and function at the root apex - phylogenetic and ontogenetic perspectives on apical cells and quiescent centres. *Plant and Soil* 167: 1-16
- Barlow P.W. (1996) Cellular patterning in root meristems: its origins and significance. En: *Plant Roots: The Hidden Half* (eds Y.Waisel, A.Eshel, & U.Kafkafi), pp. 77-109. Marsel Dekker, Inc., New York.
- Barlow P.W. (1997) Stem cells and founder zones in plants, particularly their roots. En: *Stem Cells* (ed C.S.Potten), pp. 29-57. Academic Press, London.
- Barlow PW, Adam JS (1989) The Response of the Primary Root Meristem of *Zea mays* L. to Various Periods of Cold. *Journal of Experimental Botany* 40: 81-88.
- Baum SF, Rost TL (1996) Root apical organization in *Arabidopsis thaliana* .1. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192: 178-188.
- Benjamins R, Quint A, Weijers D, Hooykaas P, Offringa R (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 128: 4057-4067
- Bitonti MB, Chiappetta A, Innocenti AM, Liso R, Arrigoni O (1992) Quiescent Centre Ontogenesis During Early Germination of *Allium Cepa* L. *New Phytologist* 121: 577-580
- Boke NH (1979) Root Glochids and Root Spurs of *Opuntia arenaria* (Cactaceae). *Amer J Bot* 69: 1085-1092
- Byrne JM (1973) The Root Apex of *Malva Sylvestris*. III. Lateral Root Development and the Quiescent Center. *American Journal of Botany* 60: 657-662

- Cheng JC, Seeley KA, Sung ZR (1995) RML1 and RML2, arabidopsis genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* 107: 365-376
- Clowes FAL (1958) Development of Quiescent Centres in Root Meristems. *The New Phytologist* 57: 85-88
- Clowes FAL (1959) Apical Meristems of Roots. *Biological Reviews* 34: 501-529
- Clowes FAL (1961) Apical Meristems. Oxford: Backwell Scientific Publications.
- Clowes FAL (1964) The quiescent center in meristems and its behavior after irradiation. *Meristems and Differentiation*, J P Miksche, W S Hillman, R M Smillie, H H Smith, M E Koshland and H J Curtis, Eds Brookhaven Symposia in Biology, Number 16, New York x: 46-58
- Clowes FAL (1976) The root apex. En: *Cell Division in Higher Plants* (eds. M M Yeoman) pp. 253-284 Academic Press, London
- Clowes FAL (1978a) Origin of Quiescence at the Root Pole of Pea Embryos. *Annals of Botany* 42: 1237-1239
- Clowes FAL (1978b) Development of the shoot apex in *Zea mays*. *The New Phytologist* 81: 663-669
- Clowes FAL (1981) The difference between open and closed meristems. *Annals of Botany* 48: 761-767
- Clowes FAL (1982) Changes in cell population kinetics in an open meristem during root growth. *The New Phytologist* 91: 741-748.
- Clowes FAL (1984) Size and activity of quiescent centres. *The New Phytologist* 96: 13-21
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84
- Dubrovsky J.G. (1996) Seed hydration memory in Sonoran Desert Cacti and its ecological implication. *Am J Bot* 83: 624-632
- Dubrovsky JG (1997) Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203: 85-92

- Dubrovsky J.G. (1997) Determinate primary root growth in *Stenocereus gummosus* (Cactaceae), its organization and role in lateral root development. En: *Biology of Root Formation and Development*. A.Altman & Y.Waisel (Eds.) pp. 13-20. Plenum Publishing Corporation, New York and London.
- Dubrovsky JG (1998a) Determinate root growth as an adaptation to drought in Sonoran Desert Cactaceae. En: *Radical Biology: Advances and Perspectives on the Function of Plant Roots*. J.P.L.H.E.Flores & D.Eissenstat (Eds.) pp. 471-474. American Society of Plant Physiologists Series, Rockville.
- Dubrovsky JG, Contreras-Burciaga L, Ivanov VB (1998b) Cell cycle duration in the root meristem of Sonoran Desert Cactaceae as estimated by cell-flow and rate-of-cell production methods. *Annals of Botany* 81: 619-624
- Dubrovsky JG, Gómez-Lomelí LF (2003) Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran desert Cactaceae, *Pachycereus pringlei*. *American Journal of Botany*. *En prensa*
- Dubrovsky JG, North GB (2002) Root structure and function. En: *Cacti. Biology and Uses*. Nobel PS (Ed.) pp 41-56. Regents of the University of California
- Feldman LJ (1984) The development and dynamics of the root apical meristem. *American Journal of Botany* 71, 1308-1314
- Gibson AC, Nobel PS (1986) *The cactus primer*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hall EJ, Lajtha JG, Clowes FAL (1962) The role of the quiescent centre in the recovery of *Vicia faba* roots from irradiation. *Radiat Bot* 2: 189-194
- Ivanov VB (1981) Cellular basis of root growth. *Soviet Scientific Reviews D. Physicochem Biol* 13: 1-70.
- Ivanov VB (1994) Root growth responses to chemicals. *Soviet Scientific Reviews D2*: 365-392.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG (1997) Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences* 158: 757-763
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130: 1429-1438
- Jürgens G (1995) Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* 81: 467-470

- Jürgens G (2001) Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J* 20: 3609-3616
- Kerk NM, Feldman LJ (1995) A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* 121: 2825-2833
- Kerk NM, Feldman LJ (1994) The quiescent center in roots of maize: initiation, maintenance and the role in organization of the root apical meristem. *Prtoplasma* 183: 100-106
- Nobel PS (1994) Remarkable agaves and cacti. Oxford University Press, NY.
- Nobel PS (1988) Environmental Biology of Agaves and Cacti. (Cambridge University Press) pp 10-42
- Raju MVS, Steeves TA, Naylor JM (1964) Developmental studies on *Euphorbia esula* L.: Apices of long and short roots. *Canadian Journal of Botany* 42: 1615-1628
- Rost TL, Bryant J.A. (1996) Root organization and gene expression patterns. *J Exp Botany* 47: 1613-1628
- Rzendowski J (1978) Vegetación de México. Limusa, México
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Genes & Development* 17: 354-358
- Scheres B (1997) Cell signaling in root development. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 501-506
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104
- Umeda M, Umeda-Hara C, Uchimiya H (2000) A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13396-13400
- Van den Berg C, Weisbeek P, Scheres B (1998) Cell fate and cell differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Planta* 205: 483-491
- Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378: 62-65

Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287-289

Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J-P, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Montagu MV, Inzé D, May MJ, Sung ZR (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* 12: 97-109

Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751-754

Wenzel CL, Tong KL, Rost TL (2001) Modular construction of the protoderm and peripheral root cap in the "open" root apical meristem of *Trifolium repens* cv. Ladino. *Protoplasma* 218: 214-224

Willemsen V, Wolkenfelt H, de Vrieze G, Weisbeek P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125: 521-531

ALGUNAS GENERALIDADES SOBRE LA BIOLOGÍA DE CACTÁCEAS

La biología de las plantas de climas áridos es relativamente poco conocida; y resulta especialmente interesante desde el punto de vista evolutivo por la serie de modificaciones que debieron ocurrir, para que tales organismos puedan sobrevivir como especie, en condiciones que resultan estresantes para la mayoría de las plantas.

Las Cactáceas conforman una familia de plantas perennes, suculentas, de hábitat diverso, la mayoría muy espinosas y cuya característica distintiva es la presencia de estructuras especializadas llamadas areolas (Britton y Rose, 1963). Están desprovistas de hojas excepto en los géneros más primitivos, *Pereskia* y *Peresklopsis*; en otras especies como las de la subfamilia *Opuntioideae* (los nopales) las hojas surgen únicamente durante los estadios tempranos del desarrollo del tallo como pequeñas reminiscencias carnosas que asemejan un bulbo en la base de la areola y en la etapa madura desaparecen (Arreola, 1997).

Las areolas son yemas de tejido meristemático, zonas de división celular, altamente especializadas en la producción de

espinas, flores, tubérculos, tricomas y glóquidas (un tipo de espinas retro-barbadas, no lignificadas en la base, características de la subfamilia *Opuntioideae*). En algunos casos las areolas se diferencian en vegetativas y reproductivas, en otros, una misma areola puede realizar ambas funciones. La producción en los ápices de tubérculos -que corresponden a las basas hipertrofiadas de las hojas- es responsable de la formación de costillas o patrones espiralados, dependiendo de la filotaxia que presente la especie. Los tricomas forman pubescencias en el ápice que cuando son muy prominentes adquieren el nombre de cefalios y regulan la temperatura del meristemo apical protegiendo a las células de la muerte por altas temperaturas o congelamiento (Nobel, 1988).

Durante la evolución de las cactáceas se trasladó la función fotosintética de las hojas a los tallos. Las hojas se perdieron y los tallos engrosaron.

El clorénquima o tejido fotosintético, es especial por estar constituido de diez a veinte capas de células fotosintéticas en lugar de tres o cinco como sucede en otras familias. Las

cutículas son gruesas (2-10 μm) y bajo la epidermis se encuentra la hipodermis, un tejido flexible que permite la expansión de la planta cuando ésta absorbe agua (Nobel, 1988). La ausencia de hojas significa menor superficie de pérdida de agua por unidad de volumen para almacenarla, una relación que crece conforme aumenta el tamaño de los cactus (Nobel, 1994). La dinámica de esta relación indica que el momento más comprometedor para la supervivencia de un cacto es la primera sequía que enfrenta cuando aun es plántula (Nobel, 1994).

El sistema vascular es de tipo cerrado, en los cactus columnares, éste forma costillas helicoidales que confieren el soporte necesario para sostener el gran tallo y la capacidad de expandir su volumen para absorber agua. (Nobel, 1988).

Las adaptaciones que presentan los cactus al nivel de la raíz, siendo no menos importantes que las de tallo, aun se encuentran poco estudiadas.

Características generales de las raíces de Cactáceas.

Las raíces y los sistemas radicales de los cactus han adquirido evolutivamente características estructurales y fisiológicas que les permiten resistir el estrés ambiental causado por sequías prolongadas, altas temperaturas, suelos pobres en nutrientes o de difícil anclaje y vientos tan fuertes

como los de huracán. Las raíces de los cactus están estructuralmente menos especializadas que los tallos, sin embargo, las funciones de toma de agua, adquisición de solutos y anclaje, son especialmente importantes para las cactáceas por las razones ya mencionadas.

La profundidad media que alcanzan las raíces en esta familia es relativamente baja; para *Ferocactus acanthodes* por ejemplo, es apenas de 8 cm y la mayoría de los cactus tienen sus raíces entre los 3 y los 40 cm de profundidad (Nobel, 1988). Las raíces de *Opuntia ficus-indica* tienen la capacidad de aumentar su superficie de absorción hasta en un 30% en tan sólo dos días de rehidratación después de un período de sequía rápida (Dubrovsky *et al.*, 1998b) producción de raíces laterales inducida por la muerte por sequía del ápice de la raíz primaria, es la principal responsable del aumento en la superficie de absorción.

Los tipos de raíces que presenta la familia son diversos y pueden dividirse en pivotantes orientadas verticalmente; de soporte orientadas horizontalmente, o en raíces de absorción que pueden ser filamentosas o gruesas como cuerdas. Las hay de tipo tubérculo, que pueden acumular almidón en grandes cantidades, y otras suculentas, especializadas en guardar agua (Dubrovsky y North, 2002). Las raíces de los cactus tienen en general menor capacidad de almacenamiento de agua que los tallos, sin embargo, en las raíces suculentas esta capacidad

es comparable a la del parénquima de almacenamiento de agua de los tallos.

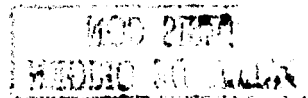
Los tejidos responsables de la retención de agua en estas raíces pueden soportar un alto grado de deshidratación sin sufrir daños irreversibles. Adicionalmente hay muchos casos de formación de raíces adventicias en tallos, como en *Opuntia ficus-indica* cuyos cladodios al desprenderse y producir raíces pueden establecerse con mayor éxito que las plántulas pequeñas constituyendo un mecanismo muy efectivo de propagación vegetativa. También es posible encontrar raíces aéreas en *Stenocereus gummosus*, cuando los tallos decumbentes tocan el suelo y producen raíces adventicias (Dubrovsky y North, 2002).

En general los sistemas radicales pueden estar compuestos de varios de estos tipos de raíces y en muchas combinaciones, sin embargo, pueden reconocerse tres principales patrones morfológicos para los sistemas radicales de cactáceas (Gibson y Nobel, 1986). El primero se compone de una raíz pivotante¹ sin raíces laterales o con muy pocas, tal es el caso de *Lophophora*. Al segundo tipo de sistema radical, lo compone una raíz pivotante y raíces laterales de muy poca profundidad como ocurre en muchos cactus columnares y biznagas como *Ferocactus*, estos sistemas pueden estar provistos o no de raíces adventicias. Por último hay un tipo de sistema radical que carece de una raíz pivotante y consiste de raíces de diversas longitudes. En las

especies de tamaño pequeño se dan numerosas ramificaciones justo por debajo del tallo, mientras que en las especies que alcanzan gran tamaño la tendencia es a desarrollar raíces superficiales muy largas que se extienden hasta cierta distancia del tallo (Gibson y Nobel, 1986).

Las adaptaciones del desarrollo como la producción temprana de pelos radicales y raíces laterales, son cruciales durante el establecimiento de las plántulas. La desecación del suelo promueve la formación de una especie de cilindros alrededor de las raíces, compuestos de partículas de suelo unidas a la superficie de la raíz por mucílago exudado por el mismo órgano. Estas capas mejoran el aprovechamiento de agua al asegurar un buen contacto entre la raíz y el suelo húmedo e impidiendo la pérdida de agua hacia un suelo más seco (Dubrovsky y North, 2002). Durante la sequía las raíces disminuyen su grosor dejando un hueco de aire entre ellas y el suelo, lo que constituye una barrera más contra la pérdida de agua (Nobel, 1994).

¹ Raíz principal orientada verticalmente



SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES

Al ser el patrón de crecimiento determinado, una alteración del desarrollo que se observa comúnmente en las raíces, se hace necesario revisar algunos rasgos básicos de la estructura y el funcionamiento de las raíces con crecimiento indeterminado que presentan la gran mayoría de las plantas.

Organización longitudinal de la raíz

o zonas de crecimiento.

Los meristemos de raíz, son las regiones a partir de las cuales el órgano crece y se desarrolla. Para su estudio los meristemos pueden dividirse transversalmente en tres zonas. Estos límites no siempre son fácilmente reconocibles, ya que cada fila de células o grupo de filas celulares tiende a actuar de forma independiente

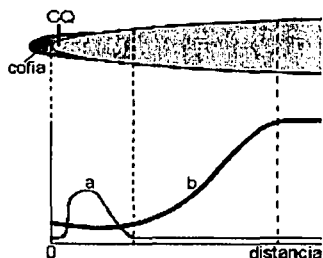


Fig 11. Distribución de la proliferación y el tamaño celular de la zona de crecimiento de una raíz común. División del ápice en tres zonas: de proliferación o meristemática (M) de elongación (E) y de diferenciación (D). Distribución de la proliferación (a) y el tamaño celular (b)

respecto a la distancia, a lo largo del ápice, desde la frontera con la cofia. Justo por encima de la frontera está el centro quieciente con tasas muy bajas de proliferación (inicio de la curva a). Modificado de Ivanov 1981.

(Rost y Bryant, 1996). Las zonas se nombran desde la más apical y son las siguientes:

1. zona de proliferación. Es el meristemo propiamente dicho. Ahí ocurre la mayoría de las divisiones celulares durante el crecimiento primario (Fig. 11), los planos de división se orientan principalmente en dirección transversal. Así se forman auténticas filas de células que a la vez son linajes celulares pues comparten un origen común al ser todas descendientes de una sola célula inicial. La alternancia ocasional de divisiones periclinales o radiales produce el patrón de divisiones "T" necesarias para la estructuración de la raíz (ver abajo). Durante el crecimiento estacionario, la zona de proliferación tiene un tamaño constante y las células que la componen, un tiempo constante de permanencia dentro de ella, que depende de la tasa de proliferación celular de la especie y de la longitud del meristemo (Ivanov, 1994)

2. zona de elongación. Las células son desplazadas de la zona de proliferación por divisiones celulares transversales que ocurren en una posición más apical dentro de la misma fila, al entrar en la zona de elongación, cesa la

actividad proliferativa (Fig. 11) y las células aumentan de 10 a 20 veces su tamaño. Debido a un crecimiento principalmente en sentido paralelo al eje de la raíz.

3. zona de diferenciación. Se caracteriza por la diferenciación de los tejidos que terminaron su crecimiento. Un criterio morfológico simple para identificar esta zona es la aparición de pelos radicales en células de la epidermis, lo cual sucede en la menor de dos células producidas por una división anticlinal desigual (Barlow, 1996). Aproximadamente al mismo nivel, se da un aumento en la complejidad de tejidos al interior de la raíz especialmente dentro del cilindro vascular y en el periciclo puede apreciarse la formación de primordios de raíces laterales.

Lo que diferencia principalmente los ápices de raíces de diferentes especies es la

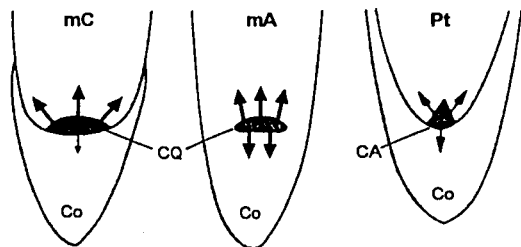


Fig 12. Diferentes tipos de organización apical, meristemo cerrado (mC), abierto (mA) y raíz de pteridofita (Pt). Las flechas representan la magnitud y dirección del aporte celular desde el extremo distal del cilindro central hacia las distintas regiones del ápice. En un meristemo cerrado (mC) la frontera con la cofia (Co) está muy marcada y el paso de células del cilindro central hacia ésta, es muy reducido. En el meristemo abierto (mA) es difícil definir la frontera de la cofia, pues recibe constantemente células del cilindro; mientras que en la raíz de pteridofitas la célula apical (CA) se encarga ella sola de generar las iniciales que dirigen el crecimiento de la raíz. CQ = centro quiescente. (Modificado de Barlow, 1976)

organización de las células en el meristemo, el modo más general de clasificar a los meristemas de raíz es en dos categorías: Abiertos y cerrados (Fig. 12). En la organización tipo cerrada las filas longitudinales de linajes celulares pueden ser seguidas hasta una hilera específica de células iniciales que las originan, llamadas histógenas. (Clowes, 1961; Rost y Bryan, 1996) En una organización de tipo abierta, todas las filas celulares convergen en una zona entre la raíz y el cuerpo, pero no es posible discernir entre las células iniciales respecto a qué tejidos van a originar; además, el paso de células del CQ hacia la columela es elevado mientras que en un meristemo cerrado el intercambio es mínimo y la frontera aparece muy bien definida (Fig. 12).

Células iniciales y centro quiescente.

En un principio se pensaba que las células iniciales eran de una a tres, como sucede en las pteridofitas (Fig. 12), que poseen una sola célula apical la cual aporta nuevas células a las diferentes zonas de la raíz al dividirse alternativamente por cada una de sus cuatro caras (Barlow 1994) Sin embargo, tanto en gimnospermas como en angiospermas se pueden distinguir dos tipos de células iniciales: **Estructurales y funcionales.** Las primeras son aquellas que dan origen al resto de las células presentes en la raíz, sin embargo al formar parte del CQ, son células que no se dividen con mucha frecuencia (Fig. 13B). Cuando lo hacen, normalmente producen células en la periferia del CQ,

que dan origen a nuevas células para el crecimiento de la raíz, por lo cual se les llama iniciales funcionales (Fig. 13B). Por lo tanto las iniciales funcionales son células que por su división dan origen activamente a todas las demás y perpetúan los patrones de división que dictan las iniciales estructurales de las cuales ellas mismas descienden (Barlow, 1994). Para que la raíz mantenga su ritmo de crecimiento es necesario el aporte de nuevas iniciales por parte del CQ pues las células que se dividen tan activamente eventualmente pierden esta capacidad y continúan su desarrollo hacia estados diferenciados (Barlow, 1997).

Formación del eje embrionario y ontogenia del CQ.

La ontogenia del CQ fue estudiada con detalle en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, primera especie cuyo genoma ha sido completamente descifrado. El embrión de *Arabidopsis* se compone de tres regiones distintas: Apical, central y basal. El cigoto se divide asimétricamente en dos células, la menor de ellas (apical) formará por divisiones un proembrión de 8 células que después dará lugar a la mayor parte del embrión (Fig. 13A). La otra célula, la mayor o basal, producirá una fila de 7 a 9 células de las cuales todas excepto la más apical constituirán el suspensor del embrión (en sí esta estructura no forma parte del embrión). La célula restante se unirá más tarde al embrión; es llamada hipófisis y da origen -24 h después de la

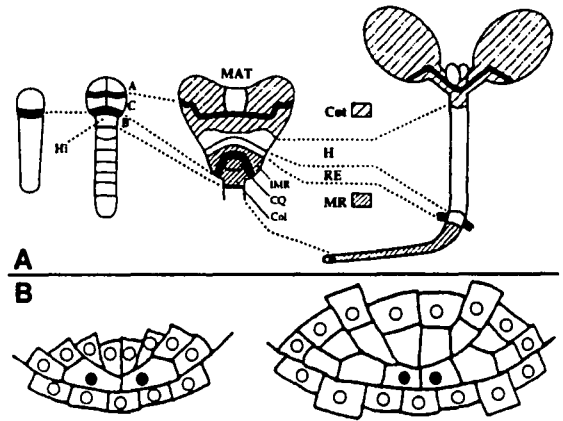


Fig 13. Origen del CQ y células iniciales. Formación del patron axial de diferenciación en *Arabidopsis* (A) por etapas de izquierda a derecha: De 2 células, de 8 células, de corazón y plántula. Inicio y expansión del centro quiescente (B) indicando los dos tipos de células iniciales. Las iniciales estructurales (●) de baja actividad proliferative establecen el patron de división, mientras que en la periferia del CQ las iniciales funcionales (○) reproducen el mismo patrón dividiendose activamente. La quiescencia es una cualidad "contagiable" a las células del entorno del CQ durante su crecimiento. (A, modificado de Willemsen, 1998; B, tomado de Barlow, 1995)

fertilización- a la región basal del embrión. Los productos de esta región son el CQ y las células iniciales de cofia (Dolan et al., 1993; Jürgens, 1995).

El tamaño y la forma de los CQ están relacionados con los patrones celulares que existen en los ápices de las diferentes especies (Clowes, 1984; Feldman, 1984). El CQ requiere de la proliferación celular para poder establecerse. En algunas especies (Clowes 1978b) se origina durante la embriogénesis y en otras se establece durante las primeras horas después de la germinación, al mismo tiempo o ligeramente después de que las células iniciales de cofia empiezan a funcionar, lo que ha sugerido que la

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

quiescencia es de algún modo una imposición de la cofia o de su actividad celular sobre ese grupo de células (Barlow 1976, y Clowes 1978a, 1984 referidos en Kerk y Feldman, 1994). Los CQ tienen la tendencia a crecer al inicio del desarrollo (Fig. 13B) Pero esta expansión no se debe principalmente a la proliferación de sus células (quiescentes) sino a la influencia que estas ejercen sobre la periferia, dónde las células adyacentes adquieren el estado de quiescencia (Fig. 14).

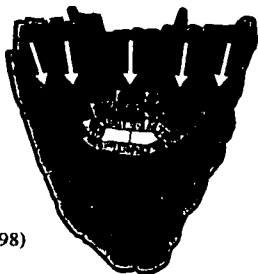
Cómo las células del centro quiescente pueden ser estimuladas para dividirse por factores que dañan las células proliferativamente activas, se ha propuesto que la activación del ciclo celular en estas células se debe a la interrupción de alguna señal química o mecánica proveniente del tejido circundante que ha sido dañado o retirado. Tales factores son: los tratamientos con radiación X o β en dosis moderadas que no impidan por completo la proliferación celular (Clowes, 1961; Hall et al., 1962), la aplicación de frío (Barlow y Adam, 1989) y la remoción de la cofia (Kerk y Feldman 1994,) Es posible que el daño causado por la radiación o el frío sea el mismo en todas las células del meristemo incluyendo al CQ y que sólo en apariencia se muestren más afectadas las células no quiescentes ya que al estar activas hacen más evidente el daño que en sus vecinas del CQ aunque estas también lo presenten. Después de un pulso de radiación lo suficientemente fuerte, como para dañar el tejido

sin matarlo, las tasas de actividad proliferativa se invierten entre el CQ y el tejido meristemático que lo rodea. Al cambiar a un estado activo, son las células del CQ las responsables de la recuperación del crecimiento radical. Una vez regenerado el órgano, el CQ se reestablece.

La progresión hacia el ciclo de las células del CQ también es inducida por la presencia de ácido ascórbico en el medio (Kerk y Feldman, 1995). Este tratamiento reduce el tamaño del CQ a un mínimo y el establecimiento de uno nuevo es más retardado respecto a los otros tratamientos que activan las células del CQ. Estas observaciones se relacionan con la abundancia en el CQ de la enzima ascorbato oxidasa -que reduce allí la concentración de ácido ascórbico-, y con la acumulación de auxina (ácido indolacético, AIA) para conformar un modelo bioquímico que explica la permanencia de estas células en la fase G1 del ciclo celular (Kerk y Feldman, 1995). En algunos casos el centro quiescente se establece durante la germinación -como ya se dijo- cuando células de los polos estelar y cortical dejan de sintetizar DNA y por ende de dividirse (Clowes, 1958). En otros casos las células del ápice que adquirieron un estado metabólico quiescente durante la maduración de la semilla no se activan al momento de la germinación (Bitonti et al., 1992). El tamaño de este CQ embrionario es el mismo que posee el centro quiescente de plantas maduras cuando se le reduce al mínimo por acción del ácido ascórbico Lo que muestra la

fuerte predeterminación que tienen las raíces para desarrollar y mantener un centro quiescente dentro de sus ápices.

Fig 14. Representación de dos señales reguladoras diferentes dentro del meristemo radical. El centro quiescente inhibe la diferenciación de las iniciales que lo rodean, mientras la información posicional proveniente de tejidos maduros, dirige la diferenciación hacia distintos tipos celulares (tomado de van den Berg et al., 1998)



Análisis de los meristemos apicales

Cuando se observa un corte de raíz que pasa por el plano del eje longitudinal de la misma, o muy cerca de él, se pueden apreciar auténticas filas longitudinales de células que siguiéndolas desde el área proximal del corte, convergen en una pequeña zona del ápice, este patrón es la manifestación del programa de desarrollo seguido por el órgano. Las filas se producen cuando una célula inicial y sus descendientes se dividen sucesivamente de modo transversal y no longitudinalmente (es decir, ni radial ni periclinalmente) por lo que cada nueva división agrega una célula a la fila. Esto hace de las filas, linajes celulares cuyos miembros comparten un origen común más reciente respecto al que comparten con el resto de las células en el meristemo y la raíz. La región más distal del ápice sin considerar la cofia es la encargada de organizar el crecimiento, las células

iniciales funcionales son las que principalmente hacen crecer las filas al dividirse transversalmente y sólo de vez en cuando son remplazadas por una nueva inicial que es aportada por una división en la periferia del centro quiescente o bien que ha ocurrido en su interior y ha provocado que una célula periférica abandone el centro quiescente, volviendo mucho más activo su metabolismo para comportarse como una inicial funcional (Barlow, 1994) Por otro lado cuando el CQ aumenta de tamaño por una división en la cual ambas hijas continúan en un estado quiescente esto permite aumentar el número de células capaces de aportar nuevas iniciales funcionales y por lo tanto la capacidad formar nuevas filas, engrosando o aumentando así la complejidad organizativa de la raíz.

Otro medio por el cual las raíces pueden aumentar o disminuir el número de filas en una zona u otra, es mediante la intercalación de planos longitudinales de división de vez en cuando entre las divisiones transversales que extienden las filas, formando nuevas filas que quedan confinadas entre las paredes de las filas adyacentes. Esto crea el patrón de **divisiones en "T"** que pueden ser normales (\top) o invertidas (\perp) las primeras provocan un aumento en el número de filas, al formar dos donde sólo había una, mientras que las T invertidas reducen este número hacia el ápice. Las \top o \perp pueden ocurrir al interior de un mismo tejido jugando el papel de una **división proliferativa** (aquella que aumenta

la población celular dentro de un tejido particular) que puede tener la función de hacer engrosar a la raíz hacia la región proximal; sin embargo, la mayor parte de las divisiones proliferativas ocurren en el plano transversal y son las que se encargan de agregar nuevas células a una fila. Los eventos de división T o \perp suceden con mayor frecuencia a menor distancia del CQ (Barlow, 1993) y la mayoría constituyen divisiones formativas, es decir, aquellas que generan nuevos tejidos debido a la divergencia morfológica y funcional que sufre la descendencia de ambas células hijas. Un ejemplo muy claro es la célula llamada Inicial de protodermis-cofia lateral (o RCP, por "Root Cap-Protoderm initial") que presenta el meristemo de *Arabidopsis* y que al ir intercalando divisiones transversales con periclinales (Fig. 4A) cada una de estas divisiones aportan una célula de protodermis y otra de cofia lateral, alternadamente (Baum y Rost, 1996). Las divisiones T o \perp también sirven para compensar las diferentes direcciones o tasas de crecimiento dentro del mismo órgano, por ejemplo si se observa una raíz desde la punta de la cofia hacia la base, puede verse que mientras la cofia va reduciendo en grosor hasta desaparecer (antes o después, dependiendo de la especie), el cuerpo de la raíz tiene que ir aumentando su diámetro para dar cabida a todos los tejidos que tiene que albergar. De este modo en la mayoría de los ápices de raíz existe una zona, normalmente hacia el centro, donde predominan las divisiones \perp y

otra periférica donde lo hacen las divisiones \top (Fig. 4B).

La producción celular en los meristemas

El sistema del cuál se ocupa este trabajo tiene como característica principal la producción limitada de células, en contraste con las raíces de crecimiento indeterminado, cuya estabilidad depende del balance que existe en el control de la producción celular sostenida.

La parte en crecimiento de la raíz está compuesta por dos zonas (la zona de diferenciación no contribuye al crecimiento de la raíz) la de proliferación o meristemática estrictamente hablando, y la de elongación. El índice mitótico –el porcentaje de células en división, en una raíz con crecimiento indeterminado, en etapa estacionaria (Dubrovsky, comunicación personal), va cambiando a lo largo del meristemo, en el CQ es prácticamente nulo, por encima de esta zona incrementa marcadamente y se mantiene así hasta la mitad o dos tercios del meristemo, después empieza a decaer gradualmente hasta volverse cero a una altura que puede variar según se trate de un tejido u otro (Ivanov, 1981) Para que el meristemo mantenga su tamaño, el número de células producido por unidad de tiempo debe ser igual al número de células que abandonan el meristemo para entrar en la zona de elongación y a su vez igual al número de células que completan su elongación (Ivanov y Dubrovsky, 1997) durante un ciclo celular se produce en el meristemo de

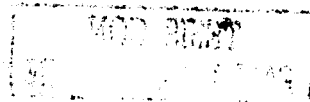
una raíz en crecimiento estacionario, el equivalente al 70% de la cantidad de células que contiene el meristemo (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Sin embargo la mitad basal del meristemo contribuye únicamente con el 28% de esta producción (Ivanov, 1981). Esto indica dos cosas: Uno, que un número importante de células (aproximadamente 22%) que entran en la mitad basal del meristemo no alcanzan a dividirse antes de pasar a la zona de elongación. Y dos, que el meristemo mantiene su tamaño, gracias al balance entre el aporte de nuevas células principalmente en la mitad apical de éste y el número de células que abandonan la parte basal si haberse dividido. La tasa de transición al estado de elongación y la supresión de la división celular parecen estar reguladas por procesos independientes (Ivanov, 1981) de modo que si la producción celular disminuye, pero la tasa de transición al proceso de elongación se mantiene, el meristemo se agota y rápidamente la raíz deja de crecer. Esto se observa en raíces tratadas con dosis muy altas de radiación que suprimen la división celular pero no el proceso de elongación (Ivanov, 1981).

La producción celular ya ha sido analizada en tres especies de cactáceas desérticas: *Stenocereus gummosus*, *Ferocactus peninsulae* y *Pachycereus pringlei* (Dubrovsky et al., 1998). Utilizando dos métodos distintos los autores determinan que la duración del ciclo celular a 29 °C para estas especies es de 9.7 (± 1.1), 11.7 (± 0.9) y 14.5 (± 0.6) horas, respectivamente. Estos

son tiempos de duplicación celular relativamente cortos comparados con los de células de maíz (Clowes 1978b) por lo que el lento crecimiento de estas especies en el desierto no está relacionado como se pensó con ciclos celulares largos. Por el contrario, los autores concluyen que tener tiempos de duplicación, cortos es una condición esencial para el rápido desarrollo de un sistema radical, por lo que esta característica de las Cactáceas debería tener una significancia adaptativa.

PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS

1. Desinfección y siembra de semillas
 2. Incubación con Bromo-desoxi-Uridina
 3. Fijación, deshidratación, infiltración e inclusión
 4. Montaje del material para microtomía
 5. Tinciones e histoquímica
 6. Inmunohistoquímica
 7. Captura y manejo de imágenes
-



1. Desinfección y siembra de semillas

Antes de empezar:

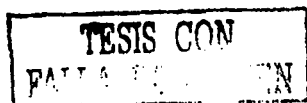
- Autoclavear....Gasas (~ 10 X 10 cm)
Agua destilada (~ 500 ml)
- Material.....Cajas con medio
Pinzas y cuchara (o espátula)
Tubo Falcon (y gradilla dónde ponerlo)
Recipiente con Et-OH 70-96 %
Vaso pp 500ml (para desechar los distintos enjuagues)
- Solución
Desinfectante.....Cloralex al 60 % (diluir con dH₂O)
(~30 ml) 0.1% Tritón (u otro detergente no iónico)

Desinfección:

1. Colocar las semillas en la solución desinfectante dentro del tubo Falcon.
Dejar en agitación suave.....10 min
2. Cambiar la solución desinfectante por dH₂O estéril dentro de la campana del siguiente modo: Abrir el tubo, tomar la gasa con pinzas estériles (en mechero o autoclave) y colocarla tapando la boca del tubo. Sujetando la gasa en su posición por los extremos más alejados de la boca del tubo, decantar el contenido en el vaso para desechos y agregar agua estéril hasta la mitad del tubo. Golpear suavemente el tubo en posición vertical contra la campana para retirar las semillas de la gasa, remover ésta, tapar y Dejar en agitación suave.....10-15 min
3. Repetir el paso 2 hasta completar cuatro lavados con dH₂O estéril.

Siembra:

1. Flamear el material de metal en el mechero y meterlo al Et-OH tres veces dejando enfriar al aire la última vez
2. Tomar con la espátula ya fría una cantidad de semillas suficiente para una caja, vaciar y distribuir sobre la superficie del medio con las pinzas esterilizadas y ya frías
3. Cerrar la caja con Parafilm o plástico auto-adherible y mantener horizontal en la cámara de crecimiento



2. Incubación en Bromo-desoxi-Uridina

Autoclave:Medio Hoagland al 20%,
Frascos limpios

Reactivos:Bromo-desoxi-Uridina stock 10 mM (concentración final 10 μ M)
Fluoro-desoxi-Uridina stock 1 mM (concentración final 1 μ M) *

1. En la campana, cuando el medio aun está caliente pero no tanto como para quemar la piel se adicionan el BrdU y el FdU agitando en círculos para mezclarlos bien y posteriormente se sirve el medio en los frascos estériles USAR GUANTES Y DESECHAR APROPIADAMENTE LAS PUNTAS DE PIPETA USADAS
2. Cuando ya se ha solidificado el medio, con ayuda de un palillo de madera grande se hacen perforaciones verticales para introducir las plántulas previamente germinadas, dejando la parte aérea fuera del medio. Se sellan los frascos con Parafilm y se les lleva a la cámara de crecimiento.

* La fluoro-desoxi-Uridina bloquea la incorporación de Timidina al DNA facilitando que la BrdU ocupe su lugar.

3. Fijación, deshidratación, infiltración e inclusión

Antes de empezar:

- Material.....Caja Petri grande
Pinzas pequeñas
Navaja
Papel celofán
Jeringas preparadas
Charolas para inclusión
Agujas de disección (2)
Parafilm
Vasos 10 ml (3)
- Soluciones.....Fijador
Etanol al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100%
Kit Historesin de LEICA (resina básica, activador y polimerizador -hardener-)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NOU 1988
MAYO 1988

Sistema de jeringas para el procesamiento de muestras de tejido para microtomía.

El material en su interior puede hacerse pasar por el tren de soluciones necesario para el proceso, de un modo limpio y sin utilizar grandes cantidades (Fig. 15)

Preparación de las jeringas:

1. Limpiar con acetona las marcas en el exterior de una jeringa de 1 o 5 ml.
2. Cortar la punta transversalmente dejando este extremo de la jeringa con forma de cilindro.
3. Calentar la punta muy brevemente en un mechero y rápido presionarla contra una malla de nylon (de $95\mu\text{m}$ el tamaño del poro, en este caso) de modo que se adhieran ambas.
4. Cortar el exceso de malla (la que no cubre el hueco de la punta)

Cómo introducir las raíces en las jeringas:

1. Colocar las plántulas sobre un pedazo de papel celofán dentro de una caja Petri grande con suficiente medio líquido (Hoagland 0.2X o el mismo que se haya utilizado para crecerlas) para mantener el papel y las plántulas mojadas.
2. Una vez cortados los ápices de raíz, se colocan en una esquina del papel y se le corta dejando las raíces ahí.
3. Se toma este fragmento y con ayuda de una pipeta se hacen caer las raíces al interior de la jeringa (Fig. 15).

Las diferentes soluciones se cambian tomándolas y desechándolas con la jeringa teniendo extremo cuidado de no dañar los ápices con el émbolo.

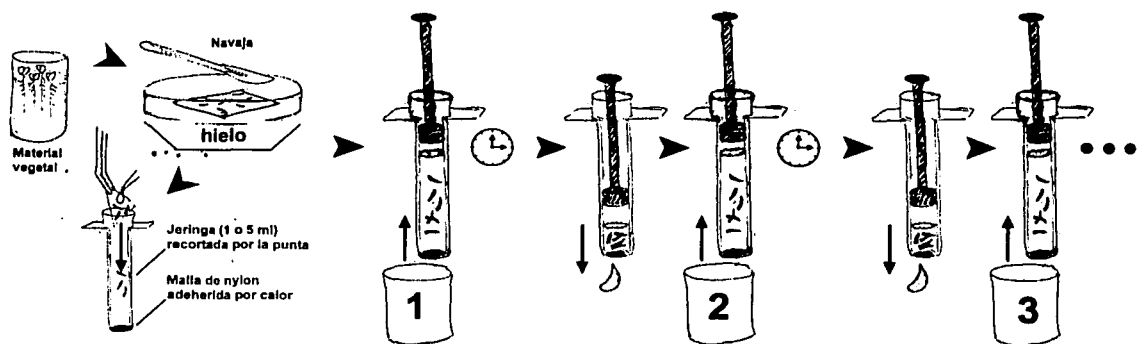


Fig 15. Método de jeringas para preparación de muestras pequeñas de material vegetal para histología. Se coloca el material dentro de jeringas previamente preparadas con una malla de nylon en el fondo y se van sustituyendo las distintas soluciones (1, 2, 3...) requeridas en el proceso. Modificado de Baum y Rost, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fijación:

Soluciones:

Fijador (1)

Stock	Concentración	final	Para preparar 10 ml
Glutaraldeído 50 %	1.5 %		0.3 ml
Paraformaldeído 10 %	0.3 %		0.3 ml
Buffer PIPES 0.1 M	0.025 M		2.5 ml
H ₂ O destilada			6.9 ml

Fijador (2)

Stock	Concentración	final	Para preparar 10 ml
Paraformaldeído 10 %	2 %		2 ml
Buffer fosfatos (K) 1 M	0.1 M		1 ml
H ₂ O destilada			7 ml

Recetas:

Paraformaldehído 10%

1. Pesar paraformaldehído seco y disolver en la campana de extracción con dH₂O caliente agitando por 5'
2. Agregar unas gotas de NaOH o KOH para disolver completamente
3. Se forma una capa de precipitado blanco: Filtrar

La solución al 10% puede mantenerse indefinidamente en el congelador

Buffer PIPES (100 ml, 0.1 M)

1. Pesar 3.024 g de PIPES sólido y llevar a 70 ml con ddH₂O estéril
2. Agitar
4. Ajustar pH a 7.2 con KOH 5M (el PIPES no se disolverá hasta no estar la solución ligeramente ácida)
5. Cuando el pH está en 7.2, aforar a 100ml con ddH₂O

Buffer fosfatos de Potasio 100 ml, 1 M

1. Pesar 13.97 g de fosfato dibásico, K₂HPO₄ (PM 174.18 g)
2. Pesar 2.69 g de fosfato monobásico, KH₂PO₄ (PM 136.09 g)

Disolver agitando y aforar a 100 ml con dH₂O. Autoclavear

Procedimiento:

Sacar el material del medio de cultivo teniendo cuidado de no dañar los ápices y pasarlo directamente a un recipiente con solución fijadora. No muy grande para no utilizar

TESTES CON
FALLA DE ORIGEN

demasiada pero con suficiente espacio para no maltratar los ápices. Las raíces en el fijador se mantienen a 4 °C por un tiempo no menor de 24 h y no mayor de 72 h

Se enjuagan las raíces para retirar el fijador en un recipiente con el mismo buffer que se utilizó para prepararlo (misma concentración) Se deben hacer tres lavados pero pueden hacerse después de colocar las puntas dentro de las jeringas dónde se van a procesar como se describe arriba

Deshidratación:

Tren de deshidratación con etanoles:

- 0) Lavados con buffer fosfatos (K) pH 7.2, 0.1 M..... 2X 15 min
- 1) Etanol 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 %.....10 min c/u
- 2) Etanol 95 y 100 % *15 min c/u

* Se puede agregar al etanol en estos pasos de 0.5 a 0.05 % de colorante Fast Green para facilitar su manejo y dar un poco de contraste independientemente de la tinción que se vaya a usar. En caso de hacerlo los tiempos deben ser de 30 y 90 min en cada paso y se debe lavar con EtOH 100% sin colorante antes de seguir adelante. En este trabajo se descartó el colorante por interferir con la fluorescencia durante la inmunohistoquímica

Infiltración:

Solución de Infiltración:

1. Agregar un sobre de activador (0.5 g) por cada 50 ml de resina básica.
2. Dejar en agitación hasta disolver por completo

Para la infiltración se utilizan las siguientes diluciones de solución de infiltración (SI, Leica) con etanol absoluto:

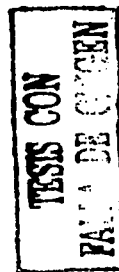
Paso	Etanol absoluto : Sol. Infiltración	Tiempo
1	3 : 1	2-3 h
2	1 : 1	2-3 h
3	1 : 3	2-3 h
4	S.I. pura	Toda la noche a 4°C

Para el paso 4 se colocan las jeringas con el material vegetal dentro de viales sellando con Parafilm para impedir la entrada de aire (ya que la humedad que contiene puede penetrar hasta los tejidos previamente deshidratados)

Inclusión

Antes de empezar.

1. Calcular el volumen de medio de inclusión para cada charola considerando una profundidad de 3 a 4 mm.
2. Calcular la cantidad de polimerizador (Hardener, del kit) necesaria para ese volumen, considerando que se debe agregar 1 ml de hardener a cada 15 ml de S.I. (16 ml volumen final).
3. Cortar un círculo de Parafilm por cada charola, del tamaño de ésta



Una vez agregado el hardener la solución polimeriza rápido y no debe ser movida. La solución de inclusión se debe preparar para cada charola de modo independiente justo antes de agregársela. La polimerización debe transcurrir sin contacto directo con el aire, para lo cual se usa el Parafilm.

Procedimiento:

1. Se vacía el contenido de una o más jeringas en una charola, se decanta la dejando el material vegetal en la charola con la menor cantidad posible de S.I. y separándolo entre sí con dos agujas SIN TOCAR LAS PUNTAS PARA NO DAÑARLAS.
2. En un vaso de 10 ml se mezclan con ayuda de una micro-pipeta de 1ml, S.I. nueva y el hardener en las proporciones calculadas. Mezclar muy bien.
3. Vaciar esta mezcla a la charola con el material; con ayuda de dos agujas distribuir el material por el fondo de la charola* SIN TOCAR LAS PUNTAS
4. Dejar la charola dónde no se le vaya a mover en las siguientes 5 h. Colocar el círculo de Parafilm sobre la superficie del medio y no tocar más. Se puede esperar 1-2 min a que empiece la polimerización para que el Parafilm no desacomode las raíces.
5. Dejar reposar al menos 24 h

* Si el material vegetal flota en el medio de inclusión es porque aun contiene etanol debido a una mala infiltración.

4. Montaje del material para microtomía

Con una segueta para microscopía electrónica se saca el material de la charola dónde fue incluido, en pequeños bloques. A estos bloques se les da forma de pirámide en cuya base menor se encuentra la raíz. Posteriormente se pegan por su base (la mayor) con algún adhesivo fuerte de secado instantáneo, sobre cilindros de madera de 1 a 1.5 cm de altura y 0.5 de diámetro. El material está listo para ser cortado en el micrótopo.

La operación del micrótopo LEICA-RM2155 utilizado para este trabajo, requiere de todo un manal aparte y no será explicada aquí.

Portaobjetos y manejo de los cortes

Una vez que son realizados, los cortes se toman individualmente con pinzas y se les coloca sobre una gota de 5 a 10 μl que se ha puesto en el portaobjetos con ayuda de una micropipeta. Si el portaobjetos se encuentra sobre una parrilla para laminillas entre 40 y 50 $^{\circ}\text{C}$ los cortes quedarán más extendidos. Se deben dejar secar por completo en la parrilla o en una estufa de baja temperatura (50 $^{\circ}\text{C}$ máx.)

Para las muestras que debían someterse al proceso inmunohistoquímico se usaron portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina que aseguran la adherencia de los cortes durante el proceso. Para otras muestras o si no se tienen estos portaobjetos se pueden preparar portaobjetos con gelatina que también aumenta la adhesión de los cortes (ver abajo)

Preparación de portaobjetos con gelatina:

Solución de gelatina al 0.5%

Disolver en 1/3 del volumen final a temperatura ambiente y luego agregar el resto del agua muy caliente

Procedimiento:

1. Lavar los portaobjetos con jabón para cocina, enjuagar con dH_2O y dejar secar protegiendo del polvo.
2. Sumergir 15 min en una canastilla en solución de etanol al 95 % con 5 % de ácido acético glacial
3. Enjuagar con dH_2O 3 veces X 5 min
4. Pasar un dedo sobre los portaobjetos varias veces para que no se queden pegados en la canastilla
5. Dejar cubiertos del polvo toda la noche a 60 $^{\circ}\text{C}$

5. Tinciones e histoquímica

Tinción de Feulgen (histoquímica)

Soluciones:

- HCl 5N.
- Reactivo de Schiff.
- Solución blanqueadora [10ml HCl 1N + 10ml $K_2S_2O_5$ al 10% + 180ml dH_2O] preparada extemporáneamente (al menos el mismo día).

Procedimiento:

- 1) Hidrólisis HCl 5N a temperatura ambiente40 min
- 2) Lavados con agua corriente y 2 lavados con dH_2O
- 3) Secar perfectamente
- 4) Reactivo de Schiff en OSCURIDAD1 h
- 5) Transferir directamente a solución blanqueadora3 x 10 min
- 6) Lavados dH_2O 3 x 10 min
- 7) Secar

Tinción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS) (histoquímica)

Soluciones:

Ácido periódico al 1 %
Reactivo de Schiff
Metabisulfito de Potasio al 2 %

Procedimiento:

- 1) Sumergir laminillas en ácido periódico en OSCURIDAD.....30 min
- 2) Lavar con agua corriente, último enjuague con dH_2O 5 min
- 3) Secar perfectamente
- 4) Sumergir en Schiff en OSCURIDAD.....60 min
- 5) Tres cambios de metabisulfito de K.....3 x 2 min
- 6) Enjuagar en agua corriente.....8 min

Tinción con azul de toluidina

- 1) Sumergir las laminillas en solución de azul de toluidina al 0.05 %30 s
- 2) Lavar con agua de la llave3 x 2 min
- 3) Lavados con dH_2O 2 x 3 min

- 4) Dejar secar perfectamente antes de montar con Permount
- 5) Montar con medio Permount usando de 60 a 65 μl por cubreobjetos de 24 x 50 mm

Tinción DAPI para microscopía de epifluorescencia

- 1) Preparar solución de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI en glicerol al 50% con 0.15% de propilgalato*
- 2) Agregar a la laminilla una cantidad aproximada de 2.5 μl por cada cm^2 del cubreobjetos
- 3) Colocar el cubreobjetos y mantener en la oscuridad 20 min antes de la observación

* El propilgalato retarda la pérdida de la fluorescencia

Tinción con yoduro de propidio para microscopía confocal*

Se sumerge el material vivo en una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio 10 min antes de la observación.

* La primera aproximación al estudio morfológico de *S. gummosus*, se hizo en el microscopio confocal. Al no poder observar el interior de las raíces se pensó que había un problema de penetración del colorante. Esto fue descartado después de incubar 10 semillas recién germinadas por 24 h en yoduro de propidio (el colorante usado para teñir apoplasto en microscopía confocal) para asegurar su penetración. Al observar nuevamente al microscopio confocal el interior de las raíces seguía sin poder verse, de dónde se concluye que el tejido es demasiado denso para ser penetrado por el láser o que éste último no tiene la intensidad que se requiere. Por lo tanto se prosiguió con la estrategia previamente planeada -más tradicional y menos rápida- de hacer cortes en el micrótopo.

6. Inmunohistoquímica para detección de BrdU en cortes

Soluciones..... HCl 1N (el concentrado normalmente es 12N)

Buffer de boratos pH 8.4

Anti-BrdU (anticuerpo primario, *BrdU detection kit*, Boehringer)

Anti-IgG_{ratón} (anticuerpo secundario, *Anti Mouse IgG FITC Conjugate*, Sgima)

Propilgalato 0.15% en glicerol al 50%

Recetas

Buffer de boratos pH 8.4

- 11 partes de ácido bórico 0.2M (disolver en dH₂O, 1.2368 g de H₃BO₃, para preparar 100ml)
- 9 partes de tetraborato de sodio 0.2M (disolver en dH₂O, 7.6274 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, para preparar 100ml)

Anticuerpos

- Anti-BrdU, (IgG de ratón) se diluye extemporáneamente en proporción 1:10 con el buffer de incubación del mismo kit (bote 4)
- Anti-IgG_{ratón}:FITC (IgG de cabra conjugado con isotiocinato de fluoresceína) se diluye extemporáneamente con buffer PBS 1X en proporción 1:10

Procedimiento:

- 1) Hidrólisis con HCl 1N.....1 h
 - 2) Neutralización con buffer de boratos.....2 x 10 min
 - 3) Lavados con PBS.....3 x 3 min
 - 4) Incubación con anti-BrdU a 37°C.....2 h
- Se tratan sólo los cortes más centrales (previamente seleccionados y marcados) con una gota de 10 µl del anticuerpo diluido y se les cubre con un pedazo de Parafilm un poco más grande que el corte tratado, es necesario guardar solución de anticuerpo para agregar por un lado cuando se esté secando **REVIZAR PERIÓDICAMENTE, NO PERMITIR QUE SE SEQUE EL ANTICUERPO SOBRE EL CORTE.**
- 5) Lavados con PBS.....3 x 3 min
 - 6) Incubación con anti-IgG_{ratón}:FITC a 37°C.....3 h
 - 7) Lavados con PBS.....3 x 3 min
 - 8) Lavado con dH₂O.....3 min
 - 9) Propilgalato 0.15% en glicerol al 50%

+ DAPI 0.5 µg/ml manteniendo en oscuridad 20 min antes de observar

7. Fotografía y manejo de imágenes

La foto-documentación se hizo con la cámara Nikon Coolpix-5000 con los siguientes parámetros:

Microscopía de epifluorescencia (Zeiss - Axioscope)

Parámetros de la cámara			
Tamaño:	UXGA	Sharpening:	Hi
Resolución:	FINE	Noise Red:	ON
Macro:	∞ ()	Auto Focus:	Continuous
ASA:	100	Zoom:	21.4 mm
Image Adj:	AUTO	Modo:	MANUAL
White Bal:	AUTO		

Imagen obtenida (40X)	Parámetros de la exposición		
	Tiempo de exposición	Apertura del diafragma (\emptyset)	Iluminación en campo claro
FITC:	1''	F 7.6	0
DAPI:	1/30''	F 5.4	0
DAPI + CL *	1/60''	F 5.4	7

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

***DAPI+CL**, es el modo que encontré para tener una referencia de las paredes celulares en las fotografías de fluorescencia, consiste en dejar pasar luz de la lámpara en campo claro, a través de la muestra al mismo tiempo que la luz fluorescente con filtro para DAPI la ilumina por arriba. Se debe encontrar un balance entre ambas iluminaciones para que ninguna predomine. Esto se hace variando la intensidad de la luz para campo claro mientras se observa la preparación en DAPI.

Se debe enfocar con la platina del microscopio observando en la pantalla de la cámara para encontrar el mejor foco. De preferencia no usar aumento artificial. La superficie del corte se muestra más granulada entre mejor sea el foco.

NOTAS IMPORTANTES:

- Siempre HACER PRIMERO LAS TOMAS DE FITC pues la iluminación para DAPI reduce fuertemente la fluorescencia en FITC.
- Es importante cuando se registra la misma raíz en los distintos modos de iluminación (FITC, DAPI y DAPI+bf) no mover la cámara ni la preparación, para que la raíz tenga la misma posición relativa en cada imagen y se puedan sobreponer posteriormente.

Composición de imágenes en Photoshop para análisis de marcaje

El objetivo es cortar sólo los núcleos de la imagen en FITC (verde) y pegarlos en el lugar que les corresponde sobre la imagen DAPI+bf para tener en una sola imagen los núcleos marcados (FITC) y los que no incorporaron marca.

Después de transferir las imágenes de la cámara a la computadora:

Abrir las imágenes en FITC y DAPI+bf de la misma raíz

Duplicar DAPI+bf (Image → duplicate) y cerrar original para conservarlo siempre intacto

1. Sobre la imagen en FITC:
2. Escoger de la barra de herramientas MAGIC WAND TOOL
3. Tocar la imagen en una región oscura fuera de la raíz
4. Botón derecho del mouse → SELECT INVERSE → Ctrl+C (copy)

Si la selección de núcleos es satisfactoria, CONTINUAR EN 5.

Si no fue seleccionado un número satisfactorio de núcleos o la selección fue tan general que tomó áreas grandes sin delimitar los núcleos:

Ctrl+D (DESELECT) →

Cambiar el nivel de tolerancia (TOLERANCE) en la ventana NAVIGATOR bajo el separador OPTIONS (Entre más grande es la tolerancia la selección abarca mayores áreas y es menos específica. Si es baja la tolerancia algunos núcleos no serán incluidos en la selección) También se pueden modificar el brillo y el contraste de esta imagen y/o probar lo siguiente:

Image→Adjust→Color Balance

Aumentar principalmente el nivel de azul y muy ligeramente el verde, esto oscurece las zonas donde no hay núcleos haciendo más específica su selección.

→ REPETIR DESDE 1.

5. En la imagen DAPI+bf: NEW LAYER → Ctrl+V (paste)

Mover (MOVE TOOL) hasta hacer coincidir ambas imágenes

Cerrar la imagen FITC SIN SALVAR LOS CAMBIOS para conservar el original.

Salvar la imagen como documento Photoshop, (extensión .psd)