

105
Rej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO HISTOLOGICO COMPARATIVO DE LOS PULVINUS
PRIMARIO SECUNDARIO Y TERCIARIO DE LA LEGUMINOSA
SENSITIVA**

Mimosa pudica L

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

Presenta

LORENA MA. LUISA LOPEZ SANCHEZ

MEXICO, D. F., JUNIO DE 1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	4
II.- ANTECEDENTES	9
CLASIFICACION TAXONOMICA	9
MORFOLOGIA GENERAL	9
ASPECTOS GENERALES	11
ASPECTOS HISTOLOGICOS DE LOS PULVINUS	16
PULVINUS PRIMARIO Y PECIOLO	16
PECIOLO	21
PULVINUS SECUNDARIO	23
PULVINUS TERCIARIO	23
MOTILIDAD	24
MOVIMIENTO RAPIDO EN <u>M. pudica</u> L.	26
CARACTERISTICAS DEL MOVIMIENTO	26
MOVIMIENTO DE RECUPERACION	27
ASPECTOS CITOLOGICOS	28
ASPECTOS ELECTROFISIOLOGICOS	34
CONDUCCION DE LA EXCITABILIDAD	34
III.- OBJETIVOS	39
IV.- MATERIAL Y METODO	40
PROCEDIMIENTO	40
TECNICA HISTOLOGICA	41
DISEÑO EXPERIMENTAL	42
PRUEBA ESTADISTICA	45
V.- RESULTADOS	46
VACUOLAS TANINAS GRANDES CON COLORANTES BASICOS	49

	Pag.
PULVINUS PRIMARIO	49
PULVINUS SECUNDARIO	53
PULVINUS TERCARIO	57
VACUOLAS TANINAS GRANDES CON COLORANTES ACIDOS	59
PULVINUS PRIMARIO	59
PULVINUS SECUNDARIO	59
PULVINUS TERCARIO	62
VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS CON COLORANTES BASICOS	65
PULVINUS PRIMARIO	65
PULVINUS SECUNDARIO	69
PULVINUS TERCARIO	70
VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS CON COLORANTES ACIDOS	77
PULVINUS PRIMARIO	77
PULVINUS SECUNDARIO	77
PULVINUS TERCARIO	81
ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA)	95
VACUOLAS TANINAS GRANDES	96
VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS	96
PULVINUS SECUNDARIO	103
VI.- DISCUSION	104
VII.- CONCLUSIONES	113
VIII.- LITERATURA CITADA	116

	Pag.
APENDICE 1	119
APENCICE 2	122
APENDICE 3	126

R E S U M E N .

Debido a que las células vegetales son capaces de excitarse respondiendo a estímulos provenientes del medio ambiente que las rodea, las plantas en general, presentan movimientos de orientación (tropismos) y de crecimiento que pueden clasificarse como reversibles e irreversibles, respectivamente; así como movimientos násticos que no responden a la dirección del estímulo y dentro de los cuales se encuentran los movimientos denominados seismonásticos que son respuestas rápidas a cambios bruscos del ambiente. Mimosa pudica es una especie que presenta peculiarmente este último tipo de movimiento, el cual es mediado por estructuras especializadas localizadas en la hoja, llamados pulvinus. Los tres pulvinus que posee esta planta son referidos como pulvinus primario, secundario y terciario.

Debido a que el movimiento de respuesta en Mimosa pudica puede ser llevado a cabo de manera distinta y aislada por los tres pulvinus y además por la sincronización de la respuesta que simultáneamente pueden llegar a alcanzar, ha sido difícil conocer hasta la actualidad su mecanismo intrínseco. Aunado a ello, habría que subrayar la falta importante de estudios histológicos que contribuyan al conocimiento del mismo, por lo que en la presente investigación se realizó un estudio histológico comparativo de los tres pulvinus, enfocado a observar posibles cambios relacio-

nados entre la posición anatómica de los mismos, el tipo de movimiento particular que presentan y la histología correspondiente a cada uno, antes y después de un estímulo mecánico. Para ello se observaron las vacuolas taninas de las células motoras de la región del margen del pulvinus (células pequeñas) y las vacuolas taninas de células motoras de la región intermedia (células grandes) de cada pulvinus. Las observaciones sobre las vacuolas taninas de las células pequeñas y grandes se hicieron dividiendo cada pulvinus en dos zonas. Se utilizaron para la tinción celular cinco colorantes, tres de ellos básicos y dos ácidos. La finalidad de utilizar estos dos tipos de colorantes fué la de observar diferencias de afinidad de las vacuolas taninas a los mismos de acuerdo a los cambios ocurridos en el pulvinus durante la actividad de su respuesta rápida al estímulo, comparando las distintas tinciones experimentales con la coloración de las vacuolas taninas obtenidas en preparaciones testigo, es decir, sin tinción.

En las preparaciones testigo las vacuolas observadas tuvieron una coloración café antes y después del estímulo en los tres pulvinus.

Después del movimiento rápido en respuesta al estímulo se observó que las vacuolas cambiaron de forma esférica a ovoide y redujeron su tamaño.

En base a las tinciones realizadas con los colorantes

básicos se comprobó estadísticamente que hubo mayor número de vacuolas de color café que de color verde antes de estimular al pulvinus. Después del estímulo se observó de modo significativo el resultado inverso, siendo las verdes más abundantes que las cafés; con los colorantes ácidos no se manifestaron cambios de tinción en las vacuolas comparados con la preparación testigo.

Los cambios en la tinción de las vacuolas con los colorantes básicos ocurrieron principalmente en la zona flexora de los pulvinus primario y terciario y en la zona lateral externa del secundario.

Antes del estímulo el número total de vacuolas taninas grandes no fué igual en los tres pulvinus. El primario presentó significativamente menor número de vacuolas que el secundario y el terciario. En el número de vacuolas taninas pequeñas, el secundario fué el que registró mayor contenido de los tres.

Después del estímulo en las vacuolas taninas grandes la relación permaneció igual y en cuanto a las vacuolas taninas pequeñas no fué posible discernir esto, ya que los resultados de los diferentes colorantes fueron contradictorios.

Por otra parte, se observó que el número total de vacuolas taninas grandes de cada pulvinus es constante y posiblemente en relación a su velocidad de respuesta.

I.- INTRODUCCION .

Todas las células vivas revelan cierta irritabilidad y pueden transmitir una excitación aún cuando sea con cierta lentitud. Las células vegetales pueden ser capaces de transmitir excitación aunque por lo general el fenómeno es tan lento que no es fácilmente apreciable a simple vista.

Los movimientos de orientación de una planta en el espacio ligados al crecimiento, se deben a su respuesta a los estímulos ambientales, particularmente a la luz y la gravedad, reaccionando de manera lenta e irreversible. También algunas plantas presentan movimientos reversibles que son cambios elásticos, generalmente causados por modificaciones en la turgencia de ciertas células. Así, las plantas presentan movimientos que responden en relación a la dirección del estímulo (respuesta trópica) o movimientos no relacionados a la dirección del mismo, los cuales son llamados movimientos násticos. Dentro de estos últimos podemos encontrar los movimientos seismonásticos, que se entienden como una respuesta rápida a cambios bruscos del medio ambiente. Estos cambios pueden ser provocados por estímulos mecánicos, térmicos, químicos y eléctricos entre otros, encontrándose este tipo de movimientos en limitadas

plantas násticas, denominadas plantas sensitivas.

Por otra parte, es interesante el hecho de que el mecanismo de movimiento que desarrollan las plantas sensitivas, resulta ser sorprendentemente semejante a los mecanismos presentes en los movimientos realizados por los animales, como lo revela el descubrimiento de potenciales de acción, en especial en Mimosa pudica, en respuesta a un estímulo seismonástico implicando una transmisión eléctrica que se propaga y que constituye parte del mecanismo de su movimiento rápido.

Dentro de un número limitado de especies násticas, Mimosa pudica además de realizar movimientos seismonásticos rápidos, también lleva a cabo movimientos násticos lentos.

Las hojas compuestas de esta planta están provistas de tres pulvinus, que son órganos especializados a los que se les ha denominado pulvinus primario, secundario y terciario, desde los cuales se lleva a cabo la propagación de potenciales de acción. De acuerdo a esto último, se podría sugerir, siendo tan rápido el movimiento de M. pudica y teniendo relevancia en su mecanismo un flujo de iones y sustancias, la existencia de un proceso mediado por transporte activo y por un sistema de apertura de canales o poros en sus membranas celulares como en las de los animales. Provocando con ello cambios en fracción de segundos en la polaridad de la membrana produciéndose los poten-

ciales de acción, lo cual es indicativo de que este evento es un proceso altamente especializado (Guyton, 1977; Schadé y Ford, 1976).

Estudios electrofisiológicos (Balmer y Franks, 1975), revelan que hay gran similitud entre los potenciales de acción, del pulvinus de M. pudica y del músculo animal, por lo que es posible que los mecanismos bioquímicos subyacentes en ambos tejidos sean similares, planteándose de esta manera el esbozo de un mecanismo altamente especializado en motilidad en el Reino Vegetal, que a su vez en el Reino Animal ha venido perfeccionándose por procesos evolutivos, hasta llegar a la compleja movilidad que exhibe actualmente.

El caso de M. pudica es como el de pocas especies en el Reino Vegetal, ya que esta especie es capaz de reaccionar como los animales en forma rápida a un estímulo externo, el cual en su habitat natural es usualmente mecánico, aunque también presenta la misma respuesta a otro tipo de estímulos como los eléctricos, térmicos, etc. (Bruria, 1981).

El movimiento del pulvinus primario en la base del peciolo puede ocurrir en 20 mseg, pero es frecuentemente más lento que los movimientos del pulvinus terciario y secundario (Bruria, 1981).

Histológicamente el tejido de los pulvinus primario, secundario y terciario también es diferente entre sí y con respecto a los demás tejidos de la planta. Algunos autores (Toriyama y Satao, 1970) llaman a las células de los pulvinus, células motoras e incluso Satter (1979) clasifica las células de un mismo pulvinus dentro de dos zonas llamadas flexora y extensora debido al carácter del movimiento.

A pesar del cúmulo de investigaciones acerca del mecanismo de movimiento de esta planta, los estudios que se han realizado tanto fisiológicos como electrofisiológicos han sido llevados a cabo principalmente en el pulvinus primario, siendo el secundario el que prácticamente no ha sido estudiado. Por tanto, la importancia de la presente investigación fué la de realizar un estudio comparativo de los tres púlvinus enfocado a observar la histología que presenta cada uno durante el reposo y después de un estímulo mecánico; que aportara evidencias respecto a posibles diferencias significativas que existiesen entre las zonas flexora y extensora de los pulvinus primario y terciario, y entre las zonas lateral interna y lateral externa del secundario, como comparados entre ellos mismos, sugeridas por la singular respuesta de movimiento exhibido en cada uno de ellos; así como la probable relación entre la histología y la posición anatómica de ellos, pretendien-

do incrementar con ello la información, a la fecha escasa, que amplíe el conocimiento sobre el mecanismo intrínseco del movimiento rápido de la hoja de Mimosa pudica.

II .- ANTECEDENTES .

Clasificación Taxonómica

REINO : Vegetal
DIVISION : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
ORDEN : Rosales
FAMILIA : Leguminosea
SUBFAMILIA : Mimosoidea
TRIBU : Mimoseae
GENERO : Mimosa
ESPECIE : Mimosa pudica L.
(Comunicación Personal).

Morfología General

Mimosa pudica es una planta que vive en zonas tropicales, es herbácea, espinosa, de unos 30 cms de altura, de hojas bipinadas, con hojuelas lineal oblongas de un centímetro de longitud; flores con cabezuelas rosadas y el fruto es una vaina articulada de 3 cm. Sus hojas se pliegan al menor contacto (Martínez, 1987). Fig. 1.

Las hojas de la planta están provistas de tres órganos motores llamados pulvinus primario, secundario y terciario. El pulvinus primario se localiza entre el tallo y el pecíolo y al ser estimulado presenta movimientos de curvamiento



Fig. 1. Planta Sensitiva Mimosa pudica.
 (A) Tallo; (B) Pulvinus Primario, (C) Pulvinus Secundario, (D) Pecíolo, (E) Inflorescencia, (F) Pulvinus Terciario, (G) Pina, (H) Pínula.
 1) Hoja No estimulada y 2) Hoja estimulada.

hacia abajo, haciendo caer a la hoja completa. Presenta un pulvinus secundario en cada una de las pinas, localizadas entre el peciolo y el raquis de cada una de las mismas, siendo cuatro pulvinus secundarios en total. Estos pulvinus al ser estimulados aproximan a las pinas entre sí. Los pulvinus terciarios, formados por pares, conectados entre el raquis y cada pínula, al ser estimulados presentan movimientos de curvamiento hacia arriba (a la inversa del primario) a lo largo del raquis.

Los tres órganos motores intervienen en los movimientos rápidos de respuesta a los diferentes estímulos dando como resultado varios eventos que tienen lugar en el parénquima cortical de los mismos. (Fig. 2).

Aspectos Generales

Algunos géneros de leguminosas como Albizzia, Samanea, Trifolium y Mimosa, presentan una característica en común, no encontrada en todos los vegetales, que es la presencia de un órgano especializado llamado pulvinus. Este es un órgano motor que les permite responder ante un estímulo externo con movimientos lentos y rápidos, presentando el género Mimosa ambos tipos de movimientos.

También es importante destacar que existe otro tipo

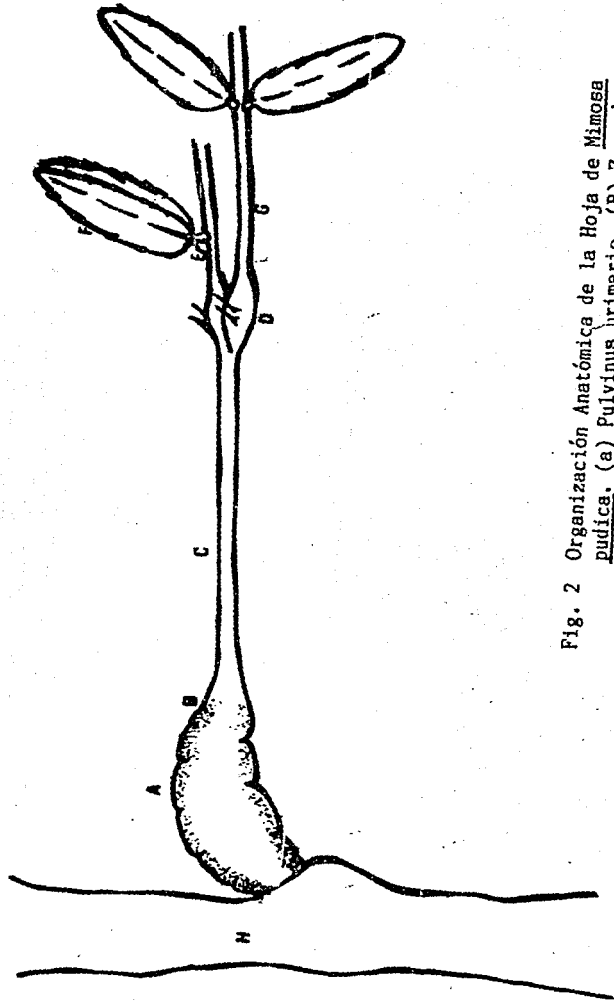


Fig. 2 Organización Anatómica de la Hoja de Mimosa pudica. (a) Pulvinus primario, (B) Zona de Transición, (C) Pecíolo, (D) Pulvinus Secundario, (E) Pulvinus Terciario, (F) Pinula, (G) Raquis, (H) Tallo.

de vegetales que tienen la capacidad de responder a un estímulo externo con movimientos rápidos como el curvamien- to de los tentáculos de las hojas de Drosera, la apertura y el cierre de la trampa de Utricularia y la apertura y el cierre de la trampa de Dionaea, consideradas como plantas carnívoras. Existen además otros tipos de movimien- tos como el de la columna de las flores de Stylidium y el de los estambres y estigmas de B. canadensis (Bruria, 1981).

En general estos tipos de movimientos llamaron tanto la atención de botánicos de siglos pasados, de cuyas obser- vaciones e investigaciones Roblin (1979), hace un bosquejo histórico. Roblin menciona que ya Aristóteles y Plutarco hablaban de la capacidad de los vegetales de percibir un estímulo; que A Costa, en 1953 y Du Fay y Du Hamel en 1736, fueron de los primeros en describir el movimiento en Mimosa pudica, pero que sin embargo, las primeras investigaciones concretas realizadas sobre la excitabilidad vegetal, utili- zando estimulación eléctrica fueron llevados a cabo en distintos años como las de Ritter en 1811 y Burdon-Sander- son en el año de 1882; lo mismo que los trabajos de Bose en 1907, de Sterner en 1927 y finalmente de Lapique duran- te 1938, quien en sus investigacioes electrofisiológicas determinara que la cronaxia en el órgano motor de Mimosa

pudica es de 0.03 segundos. También Darwin en 1882 observó que la excitabilidad del pulvinus de M. pudica aumentaba con la intensidad de la luz, y posteriormente, de 1848 a 1925 diversos investigadores contribuyeron al conocimiento del movimiento de esta planta, dentro de los cuales Bernard y Herbert fueron los primeros en observar que algunos anestésicos que actuaban en animales (éter, alcohol, cloroformo, etc.) inhibían la motilidad en M. pudica. En 1848, Brucker propuso que el movimiento de los pulvinus conllevan como resultado del mismo una pérdida de la turgencia en las células motoras y Pfeffer en 1912, sugiere que la contracción protoplasmática está relacionada con un incremento en la permeabilidad de las membranas de las mismas células. Roblin en su recopilación también cita que en el presente siglo se han realizado intensas investigaciones sobre el mecanismo intrínseco del movimiento, y que por ejemplo Dutt en 1957 y Datta en el mismo año, proponen que la vacuola central presenta características contráctiles; que Weintraub en 1952, describe una reorganización de la estructura vacuolar después del estímulo y también las investigaciones realizadas por Toriyama y Satao en 1968 y 1969, donde observaron contenido fibrilar en la vacuola central después del estímulo, concluyendo que hay una transformación en el interior de la matriz vacuolar

del estado físico de fase sol al de fase gel. Por otro lado, menciona que Toriyama en 1954, con técnicas histológicas demostró en el pulvinus primario la migración de K^+ de la célula motora a los espacios intercelulares, y observó también que el contenido de taninos es expulsado de la vacuola tanina al citoplasma de las células motoras. Toriyama y Jaffer en 1972, también estudiando a M. pudica sugirieron que los iones calcio localizados en la vacuola tanina son expulsados después del estímulo y que al mismo tiempo, el contenido fibrilar de la vacuola central altera su conformación proponiendo, por tanto, que las fibrillas pueden tener propiedades contráctiles. Posteriormente Kuo y Low en 1966, propusieron que las plantas y los animales obtienen la energía requerida para realizar sus movimientos de la molécula Adenosín Trifosfato (ATP), por medio de una proteína contráctil que puede ser la ATPasa. Por último, un dato que según Roblin resultó importante fué el observado por Watanabe en 1971, en el que describe que la Ouabaína y el glicósido cardíaco inhiben el movimiento del pulvinus y la reacción bioquímica de la ATPasa y que ahora es conocido que este glicósido inhibe la actividad del flujo de Na^+ y K^+ en varias células animales y vegetales, además de no permitir la hidrólisis de ATP por medio de la inhibición del transporte de ATPasa (Roblin, 1979).

Las investigaciones que se continúan realizando hasta nuestros días contribuyen de manera importante al conocimiento de los mecanismos que llevan a cabo su movimiento.

Aspectos Histológicos de los Pulvinus

PULVINUS PRIMARIO Y PECIOLO

El pulvinus primario presenta una forma cilíndrica que gradualmente se prolonga hacia una región de transición que se puede observar a simple vista como una zona hinchada, la cual a su vez se continúa hasta el peciolo (Toriyama y Satao, 1970).

Histológicamente el pulvinus primario presenta una gran zona de cortex compuesto de parénquima motor sensorio que rodea a su vez al cilindro vascular central. Por su posición en la planta se pueden distinguir dos zonas en este pulvinus que son: una porción superior (abaxial) con paredes celulares gruesas y una porción inferior (adaxial) con paredes celulares delgadas. Es importante aclarar que los términos abaxial y adaxial equivalentes a ventral y dorsal en las plantas, respectivamente, han llevado a muchas confusiones, ya que algunos pulvinus de plantas násticas durante el cierre y apertura de sus hojas pueden estar localizados en la mitad abaxial, mitad adaxial o en alguna

región intermedia de la hoja. Para facilitar la comprensión y evitar confusiones con dichos términos al referirse a los movimientos de los diferentes pulvinus, los términos extensor y flexor son propuestos en este trabajo para los pulvinus primario y terciario, ya que así quedan definidos en base a su función durante el cierre provocado por el estímulo, más que a su localización espacial. Para el pulvinus secundario, aunque como función presenta movimientos de aproximación durante el movimiento rápido (cierre) y de separación volviendo a su posición original durante el movimiento de recuperación, es difícil determinar qué zona está funcionando como separadora o aproximadora, por lo que en el presente trabajo, se propone utilizar los términos lateral interno (lado que se aproxima al otro pulvinus) y lateral externo (lado opuesto), quedando definidos respecto a su localización espacial en relación al eje de la planta.

En los cortes histológicos se observa que además de estas zonas, se pueden distinguir tres regiones: la del margen del pulvinus, la intermedia (entre el haz vascular y la del margen) y la interna que está en comunicación directa con los haces vasculares (Roblin, 1979). Fig. 3.

Las células del parénquima cortical son isodiamétricas, presentando el citoplasma en la periferia de las células,

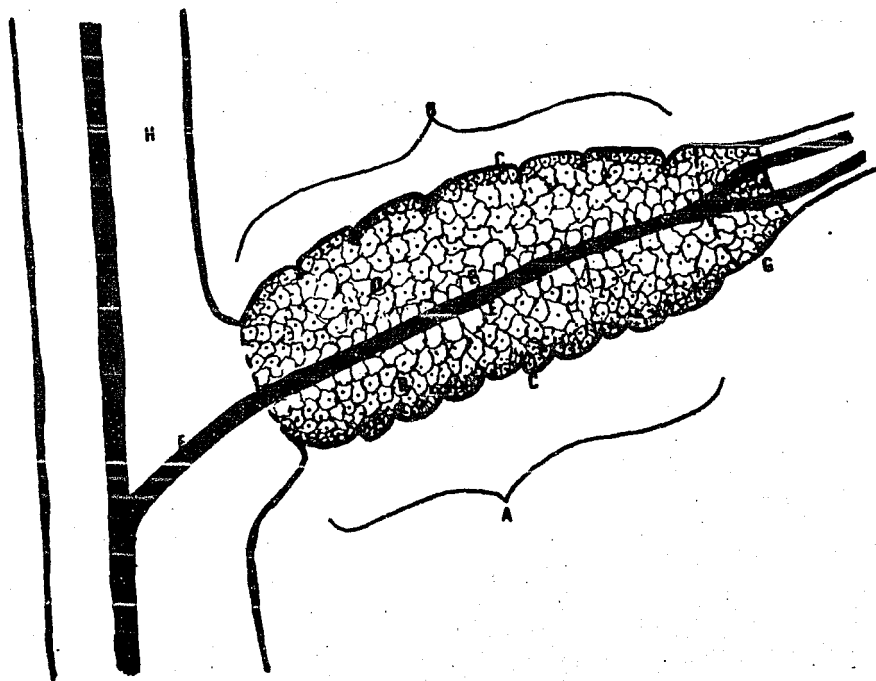


Fig. 3 Pulvinus Primario: (A) Zona Flexora, (B) Zona Extensora, (C) Células Motoras Pequeñas (del Margen), (D) Células Motoras Grandes (Intermedias), (E) Células Internas, (F) Tejido Vascular, (G) Zona de Transición, (H) Tallo.

las; contienen pocos cloroplastos, muchas mitocondrias, un núcleo redondo y un doble sistema vacuolar compuesto por una vacuola central conteniendo un tonoplasto delgado de aproximadamente 50 nm de grosor, con un contenido fino difuso y una vacuola tanina esférica. Algunas vacuolas taninas presentan cuerpos difusos densos a los electrones. (Fig. 4).

El doble sistema vacuolar únicamente se encuentra en la parte intermedia del pulvinus ya que en los márgenes del mismo las células son multivacuoladas. En las células de la epidermis, las paredes presentan plasmodesmos, los cuales se comunican con las células del parénquima cortical. En el tallo se encuentran tres haces vasculares que al entrar al pulvinus primario se reúnen formando un solo haz en la parte media de éste. En la zona de transición hacia el pecíolo estos haces se disocian en dos, colocados uno al lado del otro en forma paralela. El eje vascular del pulvinus primario presenta un floema no lignificado, donde también se pueden observar células vivas con paredes de pectocelulosa similares al colénquima con numerosos plasmodesmos distribuidos regularmente en las paredes. Este tipo de comunicación existe no sólo entre células colenquimatosas, sino también entre las células colenquimatosas y endodérmicas y entre las células colenquimatosas

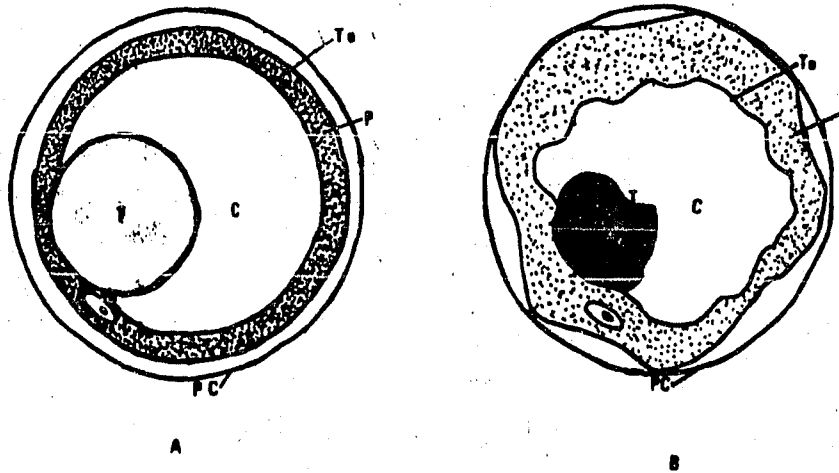


Fig. 4 Célula Motora. (A) Antes del Estimulo, (B) Después del Estimulo.
 (T) Vacuola Tanina, (C) Vacuola Central, (To) Tonoplasto, (P) Protoplasma, (PC) Pared CELular.

y las células del floema. En el xilema las células leñosas del parénquima del protoxilema presentan una pared celular gruesa sin proyecciones hacia el interior de la célula. La médula está compuesta de fibras semejantes a las del xilema pero son más pequeñas (Fleurat-Lessard y Roblin, 1982).

PECIOLLO

El pecíolo, de forma triangular, está rodeado por tres capas de parénquima cortical; este contiene grandes espacios intercelulares en las esquinas superiores del pecíolo. Las células parenquimatosas corticales están organizadas en líneas paralelas al eje y es importante observar que rodean a los grandes espacios intercelulares, los cuales están comunicados entre sí por células especiales formando puentes. Estos grandes espacios intercelulares se proyectan a todo lo largo del pecíolo hasta que desembocan dentro de los espacios del pulvinus primario. Estos grandes espacios, sin embargo, no abren dentro de los espacios intercelulares del raquis de la pina, pues en el pulvinus secundario no hay espacios intercelulares que permitan conectarlos con éste (Toriyama, 1955 VI).

Las células epidérmicas del pecíolo son más pequeñas que las células del parénquima cortical y su longitud es

paralela al plano de simetría del pulvinus. Las células del parénquima cortical contienen un aparato vacuolar compuesto de una vacuola coloidal grande y numerosas vacuolas taninas, las cuales están localizadas alrededor del núcleo. Existe también una conexión notable entre las células epidérmicas y las células parenquimatosas a través de los plasmodesmos. En el pecíolo se observa un par de haces vasculares en localización dorsal y un haz vascular principal en la parte media (Toriyama, 1955 IV).

Los componentes lignificados del eje vascular son más abundantes en el pecíolo que en el pulvinus primario, dando por lo tanto una mayor flexibilidad al pulvinus y gran rigidez al pecíolo (Fleurat-Lessard y Roblin, 1982).

La parte externa del floema está formada por fibras lignificadas. Las traqueidas y las células acompañantes están comunicadas y ambas tienen un citoplasma poco denso. El cambium es discontinuo y ligeramente desarrollado, generalmente incluye dos capas celulares conectadas por plasmodesmos. El xilema peciolar está rodeado por células parenquimatosas orientadas verticalmente. Sus paredes están particularmente lignificadas, con sinuosidades hacia el interior de la célula. El protoxilema está formado por células angostas y grandes agrupadas en filas longitudinales a lo largo del pecíolo. El crecimiento hacia dentro de la pared celular está presente en estas células, caracte-

rizadas por presentar vacuolización abundante, muchas mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico. Estas células están conectadas con la médula (Fleurat-Lessard y Roblin, 1982).

PULVINUS SECUNDARIO

En el pulvinus secundario se observa la unión de los vasos dorsales y centrales del pecíolo.

El pulvinus secundario tiene una forma cilíndrica en cuyo centro se encuentra el eje vascular, el cual está rodeado por numerosas capas de parénquima cortical, formado por células motoras, las cuales presentan un aparato vacuolar compuesto por una vacuola central y una tanina rodeada por numerosas vacuolas pequeñas.

Este pulvinus no se encontró descrito en la literatura, por lo que forma parte de los resultados de esta investigación.

PULVINUS TERCARIO

Según Weintraub en 1952 y Shill en 1981, el pulvinus terciario muestra marcadas diferencias entre sus partes flexora (superior) y extensora (inferior). La parte flexora

está constituida por una capa delgada de células del parénquima que contienen muchas vacuolas y amiloplastos. En la parte más externa de las células se localizan el citoplasma y los organelos, parte que muestra un cambio muy notable en forma y volumen celular durante el movimiento. La parte inferior tiene una capa gruesa de células vacuoladas con muchos gránulos rígidos; la capa epidérmica presenta muchos organelos teniendo en su mayor parte paredes celulares delgadas. Las células con paredes gruesas no muestran un cambio notable durante el movimiento (Weintraub, 1932; Bruria, 1981).

Motilidad

Se han estudiado varios tipos de movimientos en vegetales, como son los siguientes :

Movimientos Espontáneos.- En donde las variaciones internas del metabolismo están a menudo relacionadas con procesos endógenos rítmicos los cuales desencadenan funciones cíclicas, llamadas circadianas.

Movimientos Inducidos.- Estos se producen como respuesta a los estímulos del entorno. Se pueden subdividir en:

Tropismos.- en estos existe una relación constante con la fuente de estimulación. Entre ellos se encuentran el geotropismo, el fototropismo, etc.

Násticos .- estos son movimientos en los cuales la dirección de los mismos está determinada por estructuras y funciones de órganos especializados llamados pulvinus. Existen diferentes tipos de movimientos násticos, como la epinastia, hiponastia, nictinastia y seismonastia (Bidwell, 1979).

Un número limitado de plantas nictinásticas, incluyendo a Biophytum sensitivum, Cassia fasciculata, Mimosa pudica y M. spegazzini pueden ejecutar tanto movimientos seismonásticos rápidos como movimientos lentos. Dentro de los movimientos rápidos M. pudica es capaz de responder a diferentes estímulos que provocan una respuesta inmediata. Estos movimientos rápidos pueden responder a :

Estímulos Mecánicos (seismonásticos).

- i) Golpe o sacudimiento.
- ii) Presión localizada.

Estímulos Físicos.

- i) Cambios súbitos de temperatura (termonastia).
- ii) Efectos de elevada presión hidrostática (baronastia).
- iii) Efectos de la luz visible (fotonastia).
- iv) Estimulación eléctrica.

También presenta sensibilidad a ciertos agentes químicos como los vapores de éter, cloroformo, etc., que inhiben el movimiento de las hojas, anestesiando la planta (Roblin, 1979).

Movimiento Rápido en Mimosa pudica

CARACTERISTICAS DEL MOVIMIENTO EN RESPUESTA AL ESTIMULO

Al estimular una planta de M. pudica por medio de un golpe o sacudimiento brusco podemos dividir la respuesta al estímulo en dos fases :

Un movimiento rápido de la caída de la hoja, acompañado de la aproximación de las cuatro pinas así como el cierre de las pínulas a lo largo del raquis.

De acuerdo con la intensidad del estímulo pueden presentarse los tres movimientos simultáneamente o por separado de acuerdo al sitio de estimulación.

Cuando el estímulo es aplicado en el pulvinus primario se verifica el movimiento de curvamiento del pulvinus y de la caída de la hoja completa, pero sin estimularse el resto de los pulvinus.

Si el estímulo se aplica al pulvinus secundario, el movimiento se propaga a toda la hoja. Con la estimulación

cuidadosa del pulvinus terciario, el movimiento puede limitarse a la pina estimulada, sin propagarse al resto de las pinas y tampoco al resto de la hoja. Estos movimientos, ya sean generalizados o limitados a una zona, se caracterizan por realizarse en pocos segundos (aproximadamente de 2 a 3 seg) y por lo mismo son totalmente distintos a los movimientos lentos (Roblin, 1979).

MOVIMIENTO DE RECUPERACION

La fase de recuperación de los tres pulvinus es bastante lenta, aproximadamente de 10 a 15 min, en comparación con la fase inicial rápida (Roblin, 1979) cuando están expuestos a la luz.

En el caso del pulvinus primario que es el más conocido, el proceso de recuperación parece depender principalmente de la fotosíntesis. En presencia de luz, la concentración extracelular de Cl^- y K^+ declina a su nivel original en aproximadamente 20 min. Esto es debido a la reincorporación del Cl^- y K^+ a las células motoras; y no parece depender de una difusión simple de iones a través del apoplasto del pulvinus y de sus partes adyacentes. La reincorporación de los iones parece depender de la energía proporcionada por la fosforilación. Estudios citoquímicos del pulvinus

primario, demostraron que la concentración de fosfatasa activa tiene lugar cerca del tonoplasto en las células motoras, sólo en la mitad inferior y únicamente después de un movimiento rápido. Este hecho indica que la actividad de ATPasa participa en los procesos de recuperación en M. pudica (Samejima y Sibaoka, 1980).

Aspectos Citológicos

Los movimientos rápidos son la expresión macroscópica de la variación de turgencia que tiene lugar en las células del parénquima cortical de los pulvinus, donde se ha observado una estrecha relación de los movimientos del agua y de los iones hacia los espacios intercelulares.

La célula motora del pulvinus primario ha sido estudiada por Dutt (1957), Weintraub (1952) y principalmente por Toriyama (1955, 1962, 1967, 1968 y 1970), quienes han realizado muchas investigaciones desde un punto de vista citológico.

Toriyama observó claramente las células motoras antes de ser estimuladas utilizando vapores de éter, los cuales provocan que la planta deje de responder a cualquier estímulo, y comparando así sus observaciones con células motoras después de que recibieron un estímulo. También ha estudiado a estas células motoras antes de un estímulo, donde llegó

a observar que las células presentan una vacuola tanina grande, esférica, muy distinta de la vacuola central, la cual presenta contenidos finos con un tonoplasto delgado de 50 nm; además de la vacuola tanina observó una zona delgada de protoplasma en la periferia de las células (Toriyama, 1967c).

Weintraub (1952) encontró numerosas vacuolas pequeñas contráctiles en el citoplasma de la célula motora, alrededor de la vacuola tanina.

Posteriormente Toriyama (1967b y 1968b) siguiendo una técnica monocromática, tiñó las células motoras del pulvinus primario antes de un estímulo con hematoxilina de Ehrlich y con azul de toluidina y encontró que las vacuolas taninas presentan una coloración muy débil y sus contornos aparecen muy claros. Después de un estímulo, los contornos de las vacuolas se tornaron oscuros y se tiñeron intensamente con el mismo colorante. Además, se observaron pequeños filamentos que se tiñeron del mismo color, por lo que sugirió que son del mismo origen. También observó que el protoplasma sufría un encogimiento después de recibir un estímulo. El núcleo de las células motoras estimuladas parece ser más pequeño que en las células motoras anestesiadas. Este autor concluye que la vacuola tanina y el protoplasma tienen comunicación entre sí.

Después de ser estimuladas las vacuolas taninas reducen

su tamaño, debiéndose probablemente a la sustancia tanina que sale de la vacuola y se infiltra dentro del protoplasma. Se ha pensado que la vacuola tanina juega un papel muy importante en la fisiología del estado coloidal del protoplasma de las células motoras. Es probable que el tanino actúe en el cambio del estado coloidal del protoplasma de la célula motora, lo que puede causar el incremento de la permeabilidad de la membrana para el K^+ (Toriyama, 1967e).

Molish en 1915, propuso que la vacuola tanina puede intervenir en la regulación y preservación de la turgencia de las células motoras y que parece probable que los estímulos cambien la naturaleza fisicoquímica de la vacuola tanina durante el movimiento de curvamiento del pulvinus primario (Toriyama, 1955 VI).

En observaciones al microscopio electrónico Toriyama (1968 a) fué capaz de observar claramente diferencias en el contenido de la vacuola central del material no estimulado del estimulado. Antes de un estímulo, fueron visibles fibras finas densas de 20-30 nm de grosor y de 200-400 nm de longitud. Después del estímulo, las fibras de la vacuola central cambian en apariencia, convirtiéndose en agrupaciones fragmentadas.

Datta en 1957 mostró que la vacuola central en la célula motora es una vacuola contráctil de la cual depende

el mecanismo contráctil de la célula motora. Toriyama en 1970 observó que después de un estímulo el contenido fibrilar fragmentado de la vacuola central se reúne cerca de la vacuola tanina deformada; también que al ser estimuladas las células motoras es posible que el citoplasma influya sobre el tonoplasto y el contenido fibrilar y, éste a su vez, provoque la salida de K^+ y de alguna sustancia coloidal a los espacios intercelulares durante el movimiento. Por lo que propone que existe una relación muy estrecha entre el contenido fibrilar, el K^+ y alguna sustancia coloidal en la vacuola tanina. Ha llegado a sugerir también que el contenido fibrilar de la vacuola central sea una proteína contráctil (Toriyama y Satao, 1970).

Toriyama también realizó estudios para ver la distribución de las sales de potasio antes y después de un estímulo y encontró que antes de recibir un estímulo los cristales de las sales de potasio se localizaron envolviendo las vacuolas taninas de cada célula motora. Después de recibir un estímulo aparecen cristales en los grandes espacios intercelulares. De este fenómeno él supuso que las sales de potasio de las células motoras pasan hacia los espacios intercelulares durante el movimiento de cierre (curvamiento) del pulvinus primario. También observó la distribución de las sales de potasio en las zonas de transición entre el tallo, el pulvinus y el pecíolo antes y después del

estímulo. Observó que antes del estímulo en el protoplasma de las células parenquimatosas transicionales habían pocos microcristales de sales de potasio, pero que después de suceder el estímulo éstos se agrupan en el tejido. Esto mostró que el potasio pasa a través del tejido motor (Toriyama, 1955 VI).

Además de la distribución de las sales de potasio Toriyama (1962) también realizó estudios sobre la migración de soluciones de potasio en el pulvinus primario y en el pecíolo, encontrando que la migración de potasio se observa en las células del parénquima del floema, parénquima del xilema, protoxilema y parte de la médula. El mismo fenómeno lo encontró en el parénquima del cortex.

Después del estímulo en el pulvinus primario, también se ha encontrado un incremento en la concentración de Cl^- en los espacios intercelulares. Este incremento se inicia alrededor de una décima de segundo después de producirse el potencial de acción y simultáneamente a la respuesta mecánica (Samejima y Sibaoka, 1980).

En cuanto al Ca^{++} se ha encontrado que parece ser efectivo para mantener la forma esférica de la vacuola tanina en las células motoras (Toriyama y Komada, 1970).

También se han realizado experimentos donde se muestran los contenidos de los iones de potasio, cloro y calcio y se ha visto que no se encuentran en las mismas concentra-

ciones en toda la hoja compuesta de Mimosa pudica. Se ha visto que el potasio se encuentra en mayor cantidad en la parte inferior (zona flexora) del pulvinus primario, siguiéndole en cantidad el pulvinus secundario, luego la parte superior del pulvinus primario y por último las hojuelas. La mayor cantidad de potasio en toda la planta se encuentra en los pulvinus. La distribución del Cl^- está estrechamente relacionada a la del K^+ en varias partes de la planta, excepto en el pecíolo, donde el contenido de Cl^- es bajo. Se ha observado que existe una relación inversa entre las concentraciones de K^+ y Ca^{++} ; cuando se encuentran grandes cantidades de K^+ se puede observar gran plasticidad (por ejemplo en el pulvinus primario) y por lo contrario, si se encuentran grandes cantidades de Ca^{++} hay poca plasticidad en el tejido, como sucede en las hojuelas (pínulas). Por otra parte, se ha pensado también que el H^+ puede jugar algún papel importante en la regulación del pH en el citoplasma celular y en la energización del transporte de iones y solutos orgánicos (Roblin y Fleurat-Lessard, 1983).

En otras investigaciones se ha postulado que los flujos de potasio dentro y fuera de la célula motora pueden estar relacionados con flujos de H^+ en dirección opuesta. Este flujo puede estar involucrado durante el movimiento pulvinar por efectos antagonistas de la glicina y se piensa que

hay un co-transporte protón-aminoácido (Otsiogo-Oyabi y Roblin, 1985).

Aspectos Electrofisiológicos

CONDUCCION DE LA EXCITABILIDAD

Al estimularse el pulvinus ocurre una despolarización de la membrana, reduciéndose el potencial de la misma hacia 0.0 mV, transformándose eléctricamente más positivo el medio interno, hasta llegar a un nivel crítico, el umbral, que provoca la iniciación de un impulso. Esto se debe a que existe una salida de K^+ y Cl^- a los espacios intercelulares de los pulvinus, cambiando la permeabilidad de la membrana hacia los iones de K^+ y Cl^+ , produciéndose potenciales de acción (Samejima y Sibaoka, 1982).

Cuando Mimosa pudica es estimulada, un potencial de acción es generado en las células excitables en el sitio estimulado y se propaga a través del tallo, peciolo y raquis. Las células parenquimatosas alargadas del floema y del protoxilema son excitables y son las células por medio de las cuales se lleva a cabo la transmisión del potencial de acción. Siempre que un potencial de acción proviene a través del peciolo o del tallo, un potencial de acción es producido en el pulvinus propagándose a todas

las células motoras del mismo, desencadenando así todo el proceso citológico de respuesta en el interior del pulvinus que concluye con el movimiento rápido del cierre (curvamiento) pulvinar (Samejima y Sibaoka, 1982).

Se ha visto que los potenciales de membrana de células motoras son más electronegativos que los de otras células de la planta. Además, se ha observado también que los potenciales de membrana en reposo de las células excitables en el pecíolo y en el pulvinus son muy similares. Sin embargo, las formas y las amplitudes de los potenciales de acción son diferentes entre ambos tipos celulares. La resistencia de la membrana súbitamente decrece alrededor del inicio del potencial de acción pero retorna a su valor original en muy pocos segundos. Esto coincide con la salida de K^+ y de Cl^- de las células motoras al espacio intercelular durante el curvamiento del pulvinus primario (Samejima y Sibaoka, 1982).

También se han realizado estudios al microscopio electrónico mostrando que las células excitables del pulvinus primario presentan numerosos plasmodesmos. En base a estas observaciones Abe y Oda, en 1982, realizaron estudios sobre la resistencia de la membrana en células excitables del pulvinus durante su estimulación y ellos observaron que las células que presentan numerosos plasmodesmos tienen una resistencia específica de membrana muy baja; mientras

que las células que tienen poco o no tienen plasmodesmos presentan una resistencia específica alta. Al respecto se ha propuesto que la disminución de la resistencia del pulvinus parece ser debida a un flujo de solución electrolítica de las vacuolas de las células excitables hacia el espacio intercelular del tejido pulvinar (Abe, 1980; Abe y Oda, 1982).

En otras investigaciones se ha reportado que las células excitables del pulvinus que generan un potencial de acción existen principalmente en la parte media inferior del pulvinus primario y que el encogimiento y el potencial de acción fueron observados solamente en ella. Los potenciales de acción no fueron observados en la mitad superior, por lo que se propone que esto se deba a que la mitad superior presenta menor número de células excitables y/o la extensibilidad de la pared celular sea menor en el córtex superior que en el inferior, aunque ambas mitades son excitables. Esto apoya la hipótesis de que el movimiento hacia abajo del pulvinus primario resulta de una expansión de las células de la mitad superior, cuando el balance de tensión entre las dos mitades está determinado por una pérdida súbita de la turgencia en las células de la mitad inferior (Abe, 1980).

La respuesta electrofisiológica a un estímulo eléctrico efectivo en Mimosa pudica se compone de tres tipos de ondas

oscilográficas que dependen de las condiciones de la planta y de la región desde donde se registra la propagación del estímulo; las ondas se han descrito de la forma siguiente:

a) ONDA MEDIA

Esta onda se origina cuando se estimula a la planta sin causarle ningún daño. Está caracterizada por la propagación de un potencial de acción con una forma y amplitud de alrededor de 50 - 100 mV por el tejido vivo, similar a la del axón de las células nerviosas de los animales de acuerdo a su característica de responder con un potencial de acción completo o con ninguno, llamada "ley" del todo o nada. Aunque sin embargo, la espiga en M. pudica tiene una duración más prolongada (aproximadamente 3 seg) en relación con el nervio. Este tipo de propagación puede ser determinado por área de tejido muerto (Roblin, 1979).

b) ONDA-S (conducción lenta)

Esta onda puede ser originada cuando el estímulo provocado a la planta es dañino (cortadura, quemadura o herida). Esta onda puede dividirse en dos fases, que son :

La espiga A con una amplitud de 20 mV que antecede a la espiga B que es una onda más larga y negativa. Se piensa que estas dos fases de la onda-s puedan corresponder a procesos fisiológicos distintos (Roblin, 1985).

c) ONDA-R (conducción rápida)

Este tipo de conducción siempre está relacionado con las ondas lentas y medias, y es inducida solamente por traumatismos muy severos, principalmente si las hojas son jóvenes y están en crecimiento. Su mecanismo de producción no es conocido aún (Roblin, 1979).

A pesar de los estudios realizados sobre el movimiento rápido en Mimosa pudica, la mayoría de ellos están relacionados con el pulvinus primario, siendo prácticamente nulos los trabajos sobre los pulvinus terciario y secundario, sobre todo de este último, siendo además, pocos los trabajos histológicos y ausentes las investigaciones comparativas entre ellos. Para contribuir al conocimiento del mecanismo de movimiento rápido en esta especie, se realizó un estudio comparativo con el fin de relacionar la histología y la actividad de los tres pulvinus, con respecto al movimiento particular que presentan.

III.- OBJETIVOS .

- 1) Identificar diferencias histológicas en y entre los pulvinus relacionadas a la actividad de respuesta a un estímulo seismonástico (mecánico).

- 2) Comprobar la relación entre la histología, el tipo de movimiento y la velocidad de respuesta al estímulo mecánico de cada pulvinus.

IV.- MATERIAL Y METODO .

Procedimiento

Las plantas fueron colectadas de los potreros aledaños al municipio de Coatepec, Estado de Veracruz, colocadas en macetas y transportadas a la ciudad de México, donde se conservaron al aire libre.

Los pulvinus de la planta fueron estudiados comparándolos antes y después de recibir un estímulo mecánico. Para obtener y analizar los pulvinus antes de recibir el estímulo las plantas fueron expuestas a vapores de éter durante 30-40 minutos, anestesiándolas dentro de una campana de cristal, de tal manera que las plantas no presentaran ninguna respuesta al ser manipuladas.

Para estudiar la respuesta de los pulvinus, se estimularon mecánicamente dándoles un golpe a las hojas con el dedo índice de la mano hasta observar que el pulvinus primario se curvara en dirección de la gravedad, que los pulvinus secundarios se aproximaran lateralmente entre sí y que los terciarios presentaran los movimientos de unión ventral de las pinas a todo lo largo del raquis.

Tanto los pulvinus anestesiados como los estimulados se disectaron de la hoja y se colocaron de inmediato en el fijador de Müller durante 24 hrs; al término de este tiempo el material fué tratado según los siguientes pasos:

TECNICA HISTOLOGICA

Agua corriente	12 hrs	
Dioxano al 70 %	4 "	
Dioxano al 95 %	4 "	(dos veces)
Dioxano al 100 %	4 "	(dos veces)
Parafina:Dioxano	4 "	(tres veces)
Parafina	12 "	(tres veces)

La parafina utilizada fué de punto de fusión de 56 °C (Merck).

Inclusión Definitiva

Se realizaron cortes longitudinales de los pulvinus de 10 micras de grosor en un microtomo de rotación. Los cortes colocados en portaobjetos se conservaron durante 24 hrs en una estufa a 37 °C de tal manera que no se desprendieran.

Xilol	15 "	(dos veces)
Alcohol al 100 %	15 "	(dos veces)
Alcohol al 96 %	15 "	(dos veces)
Agua destilada	15 "	
Tinción monocromica	3 "	

La tinción se realizó con los colorantes básicos Azul de Toluidina, Azul de Cresilo Brillante y Azur II, y con los básicos Azul de Anilina y Azul de Bromofenol (Apéndice I).

Todos los colorantes fueron preparados en solución acuosa al 0.5 %.

Después de la tinción los cortes se lavaron y deshidrataron mediante cambios rápidos de la forma siguiente:

Agua destilada	
Alcohol al 96 %	(dos veces)
Alcohol al 100 %	(dos veces)
Xilol	(dos veces)

Después que los cortes fueron teñidos y montados en Bálsamo de Canadá, se procedió a realizar las observaciones en un microscopio de contraste de fase (Carl Zeiss) en campo claro en el espacio de aumento del objetivo de 100x.

Con fines comparativos se utilizó como referencia una preparación testigo en la cual no se realizó la tinción.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Cada pulvinus se dividió en cuatro regiones con respecto al eje de la planta, localizadas dentro de las zonas en que se clasifica cada pulvinus. A estas regiones en que se dividieron los pulvinus, se les asignó una letra distinta para diferenciarlas y facilitar su comparación antes y después del estímulo. (Fig. 5 y Fig. 5a).

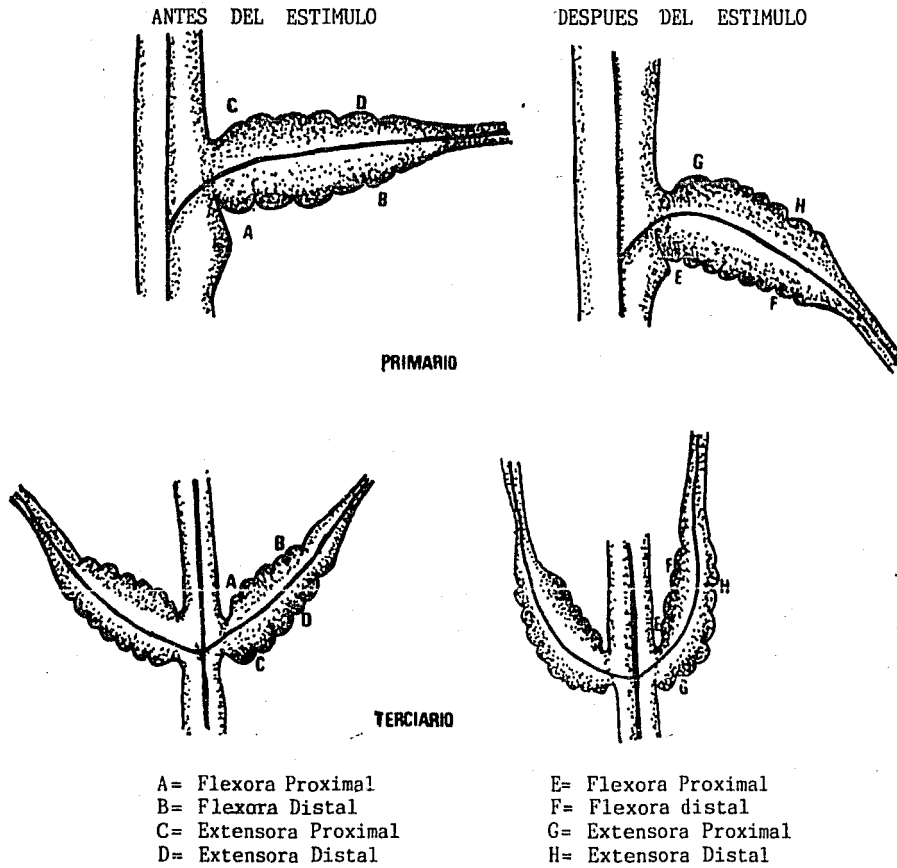
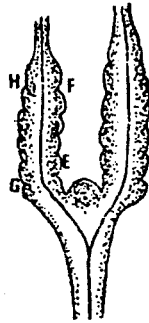
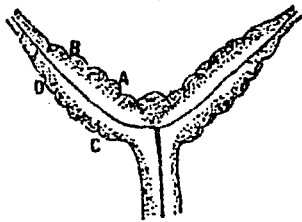


Fig. 5. Regiones en que se dividieron los pulvinus y su letra correspondiente antes y después del estímulo.

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO



A= Lateral Interna Proximal
 B= Lateral Interna Distal
 C= Lateral Externa Proximal
 D= Lateral Externa Distal

E= Lateral Interna Proximal
 F= Lateral Interna Distal
 G= Lateral Externa Proximal
 H= Lateral Externa Distal

Fig. 5a. Regiones en que se dividió el pulvillus secundario y su letra correspondiente antes y después del estímulo.

Para los tres pulvinus se realizaron cuatro repeticiones de las observaciones sobre la forma, el color, el tamaño y el número de vacuolas taninas de las células motoras del margen (pequeñas) e intermedias (grandes), antes y después de estimularlos.

Prueba Estadística

Para el análisis estadístico de la región más activa, únicamente se analizaron el color y el número de las vacuolas taninas grandes y pequeñas de las 4 regiones de un mismo pulvinus, comparándolas antes y después del estímulo, empleando la prueba a distribución libre de rangos de Kruskal-Wallis (Apéndice 2).

Se analizaron los rangos del número de vacuolas taninas grandes y pequeñas de color verde y café, por separado. Los pulvinus también fueron comparados entre sí.

Para comparar el número total de vacuolas taninas (verdes más cafés) grandes y pequeñas de cada pulvinus y determinar posibles diferencias entre ellos, así como la relación entre el número total de vacuolas taninas y su velocidad de respuesta, se realizó un diseño factorial de dos factores (bifactorial; Apéndice 3).

V .- RESULTADOS .

El empleo de los dos tipos de colorantes, ácidos y básicos, se realizó con la finalidad de observar mediante cambios de afinidad a los mismos, las alteraciones que pudieran ocurrir en las vacuolas taninas grandes y pequeñas durante la actividad fisicoquímica de las células motoras en su respuesta rápida al estímulo.

De acuerdo a ello, en efecto, se observaron cambios en las vacuolas taninas de los tres pulvinus después de recibir el estímulo.

Dichos cambios se manifestaron, de acuerdo a lo esperado, como modificaciones en la afinidad del contenido vacuolar hacia los colorantes, ya que antes de estimular los tres pulvinus, sus vacuolas fueron casi en su totalidad de color café, y después del estímulo viraron a una coloración verde; principalmente con los colorantes básicos (Azul de Toluidina, Azul de Cresilo Brillante y Azur II).

Se consideró a la coloración verde lograda después del estímulo como indicadora de la actividad de las vacuolas motoras en respuesta al estímulo, debido a que las tinciones se compararon con preparaciones testigo, es decir, preparaciones procesadas con la misma técnica que para las experimentales, excepto que no fueron teñidas. Las vacuolas de estas preparaciones testigo tuvieron siempre una coloración

café, semejante al de las vacuolas que no recibieron el estímulo, lo cual significa que antes de estimular a los pulvinus casi no hay actividad de los mismos, aunque se registren en ellos vacuolas de color verde, color predominante después de estimularlos.

Como el primero de los objetivos fué comparar histológicamente la actividad de los pulvinus en respuesta al estímulo, se compararon entre sí antes y después de estimularlos, de acuerdo a la clasificación de los mismos en las zonas flexora y extensora (primario y terciario) y lateral externa e interna (secundario) con sus respectivas regiones. Para ello se utilizó la prueba estadística no paramétrica a distribución libre de rangos de Kruskal-Wallis con una prueba de comparación múltiple (Apéndice 2). Mediante las mismas se detectaron las regiones más activas de los pulvinus y por tanto su zona de mayor actividad.

Los resultados expuestos a continuación corresponden tanto al estado de reposo (antes del estímulo) como a los cambios en número y color de vacuolas taninas grandes y pequeñas provocados por el estímulo. Así mismo se presentan las tablas para vacuolas taninas verdes y cafés con la suma de rangos de Kruskal-Wallis y el nivel de significación (N.S.) en base a la prueba de comparación múltiple. La separación de grupos de las regiones (proximal y distal)

con diferencias significativas entre sí en el número de vacuolas antes (A,B,C y D) y después (E,F,G y H) del estímulo, se indican empleando letras minúsculas (a,b,c,ab,cd,..), de tal manera que aquellas regiones entre las que no hay diferencia significativa aparecen unidas por la misma letra (aaa,bb,ccc,...), debajo del nivel de significación.

Los dibujos abajo de las tablas muestran la región que sufrió más cambios (más activa) después del estímulo, con un área sombreada.

Para las vacuolas taninas de color café únicamente se presentan las tablas.

VACUOLAS TANINAS GRANDES (INTERMEDIAS) CON COLORANTES BASICOS
(Azul de Toluidina, Azul de Cresilo Brillante y Azur II)

PULVINUS PRIMARIO

Antes del Estímulo.- Se registró que las regiones proximales y distales de la zona extensora no presentaron diferencias significativas entre sí con respecto al número de vacuolas verdes, con los tres colorantes básicos. Sin embargo, entre las regiones proximales y distales de la zona flexora sí se registraron diferencias significativas con respecto al número de vacuolas verdes, principalmente con los colorantes Azul de Cresilo Brillante y Azur II.

Después del Estímulo.- Se observó un aumento significativo de vacuolas verdes en las cuatro regiones, pero este aumento fué mayor en la zona flexora que en la extensora. Sin embargo, dentro de la misma zona flexora se observó que la región distal fué más activa que la proximal, pues presentó mayor número de vacuolas verdes distinguiéndose claramente con los colorantes Azur II y Azul de Cresilo Brillante. Con el Azul de Toluidina las observaciones fueron registradas en el sentido inverso, es decir, se observó mayor cantidad de vacuolas en la región proximal (Tablas I, II y III).

TABLA I.- Vacuolas Taninas Grandes de Color Verdes Observadas con AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	107.5	a
D	103.5	a
A	91.0	a
F	72.5	ab
E	57.0	b
G	56.5	b
H	24.0	c
B	16.0	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

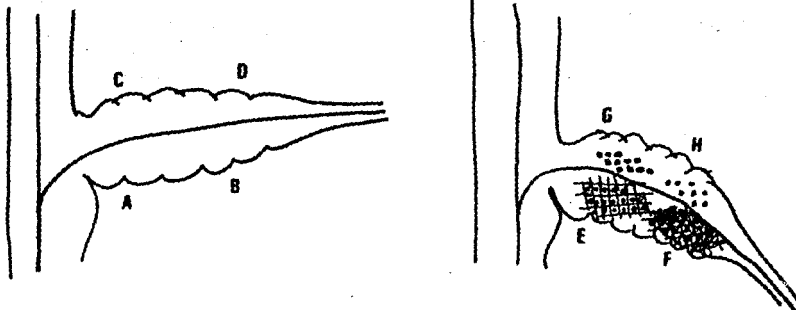


TABLA II.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE CRESILO BRILLANTE. Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S. *
A	93.5	a
F	91.0	ab
E	89.0	ab
H	73.0	bc
D	71.5	bc
C	54.0	c
G	28.5	d
B	27.5	d

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

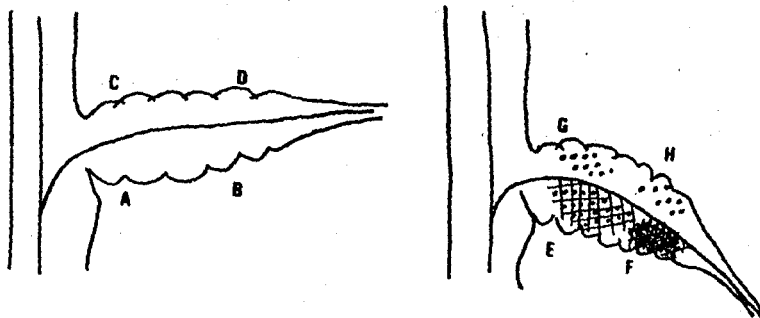


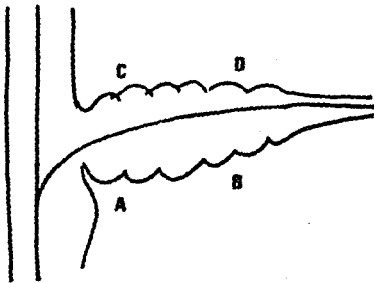
TABLA III.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

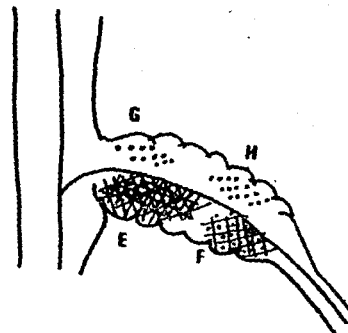
REGION	RANGO	N. S. α
E	116.0	a
F	111.0	a
G	85.0	b
H	80.0	b
A	34.0	c
B	34.0	c
C	34.0	c
D	34.0	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



PULVINUS SECUNDARIO

Antes del Estímulo.- Con los colorantes básicos se observó menor número de vacuolas verdes en la zona lateral-externa que en la interna, presentándose diferencias significativas entre las regiones proximal y distal de cada zona, registrándose mayor número de vacuolas verdes en la región proximal.

Después del Estímulo.- Se observó un aumento significativo en todo el pulvinus, siendo más notable en la zona lateral externa, principalmente en su región proximal, con los tres colorantes básicos (Tablas IV, V Y VI).

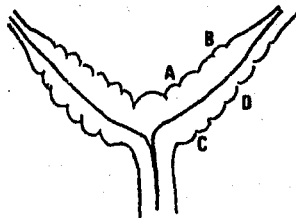
TABLA IV.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
E	107.5	a
G	99.5	a
F	90.0	ab
H	76.5	bc
A	64.0	c
B	50.5	c
C	28.0	d
D	28.0	d

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

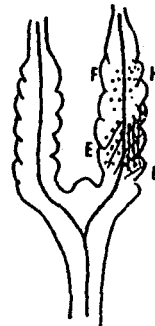


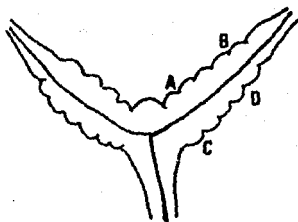
TABLA V.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE CRESILO BRILLANTE.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
F	99.0	a
G	98.5	a
E	97.0	a
H	84.0	ab
B	68.5	b
A	45.0	c
C	18.0	d
D	18.0	d

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

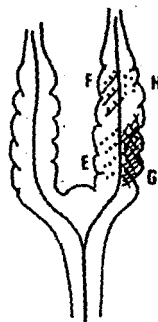


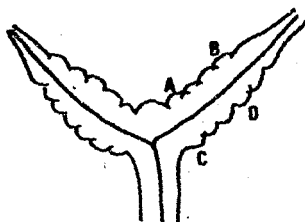
TABLA VI.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

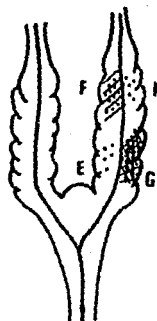
REGION	RANGO	N. S.*
B	106.0	a
A	101.0	a
G	92.0	a
F	68.0	b
E	59.0	b
H	52.0	b
D	32.0	c
C	18.0	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



PULVINUS TERCARIO

Antes del Estímulo.- En este pulvinus, se detectó que la zona extensora presentó menor número de vacuolas verdes que la zona flexora. Las regiones proximal y distal de todo el pulvinus no registraron diferencias significativas entre ellas con los tres colorantes.

Después del Estímulo.- Con los colorantes Azur II y Azul de Cresilo Brillante no se registraron diferencias significativas, por lo que se consideró no necesario presentarlas.

Con Azul de Toluidina se observó un aumento significativo de vacuolas verdes en todo el pulvinus, principalmente en la zona flexora, presentándose los mayores cambios en su región proximal. La zona extensora presentó diferencias significativas entre sus regiones distales y proximales, mientras en la zona flexora no se presentaron estas diferencias, aunque, comparando ambas zonas entre sí no presentaron diferencias (Tabla VII).

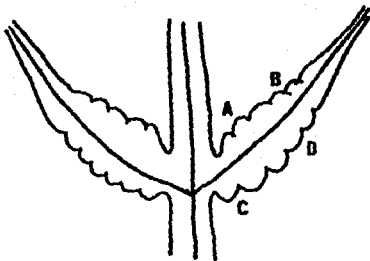
TABLA VII.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

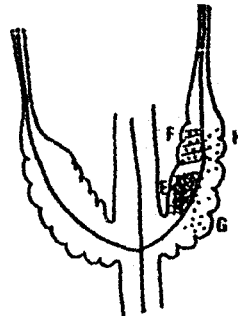
REGION	RANGO	N. S.*
E	113.0	a
F	92.0	b
G	82.5	b
H	76.0	b
A	47.5	c
B	45.0	c
C	36.0	c
D	36.0	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



VACUOLAS TANINAS GRANDES (INTEREDIAS) CON COLORANTES ACIDOS
(Azul de Anilina y Azul de Bromofenol)

PULVINUS PRIMARIO

Antes del Estímulo.- No se observaron vacuolas taninas de color verde en todo el pulvinus con los dos colorantes ácidos.

Después del Estímulo.- Hubo un aumento significativo de vacuolas verdes en todo el pulvinus principalmente en la zona flexora distal con el azul de anilina, mientras que con el Azul de Bromofenol se observó el aumento en la zona flexora proximal (Tablas VIII y IX).

PULVINUS SECUNDARIO

Antes del Estímulo.- Con el colorante Azul de Anilina no se observaron vacuolas color verde en todo el pulvinus.

Con el colorante Azul de Bromofenol se observaron algunas vacuolas de color verde que no representaron diferencias significativas.

Después del Estímulo.- Se registró un aumento en todo el pulvinus, aunque no fué significativo, con los dos colorantes ácidos.

TABLA VIII.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
F	117.0	a
H	102.0	ab
G	87.0	bc
E	80.0	c
B	46.0	d
A	32.0	d
C	32.0	d
D	32.0	d

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

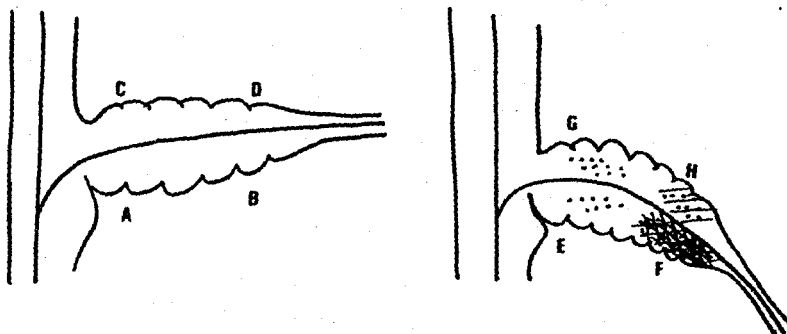


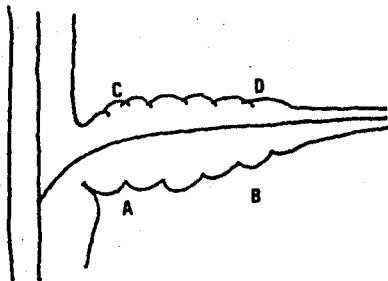
TABLA IX.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

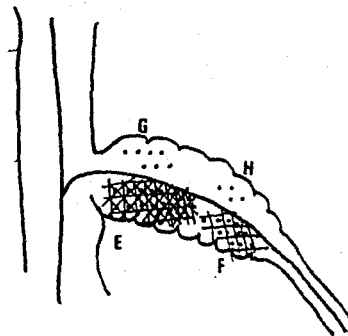
REGION	RANGO	N. S.*
E	120.0	a
F	84.0	b
A	54.0	c
B	54.0	c
C	54.0	c
D	54.0	c
G	54.0	c
H	54.0	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



PULVINUS TERCARIO

Antes del Estímulo.- Con el colorante Azul de Anilina no se observaron vacuolas verdes antes del estímulo.

Con el colorante Azul de Bromofenol se observaron vacuolas de color verde en todo el pulvinus, encontrándose diferencias significativas entre las zonas flexora (con mayor número de vacuolas) y extensora.

Después del Estímulo.- Con el colorante Azul de Anilina se registró un aumento significativo únicamente en la zona extensora proximal.

Con el colorante Azul de Bromofenol se observó una disminución significativa de las vacuolas en todo el pulvinus, principalmente en las regiones extensora y flexora distal (Tablas X y XI).

PREPARACION TESTIGO

En la preparación testigo las vacuolas observadas fueron de color café tanto antes como después del estímulo.

TABLA X.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
G	94.0	a
A	62.0	b
B	62.0	b
C	62.0	b
D	62.0	b
E	62.0	b
F	62.0	b
H	62.0	b

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

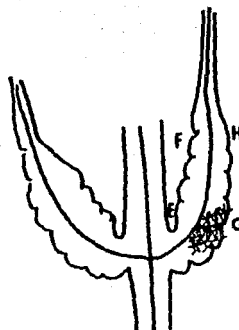
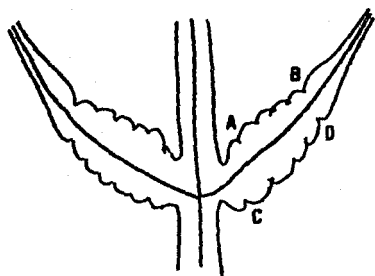


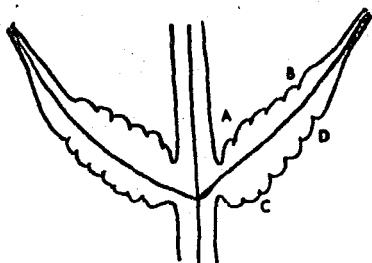
TABLA XI.- Vacuolas Taninas GRANDES de Color Verde Observadas con AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

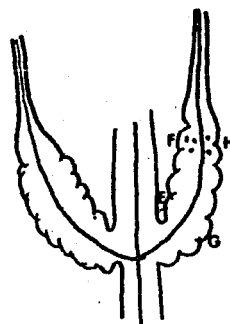
REGION	RANGO	N. S.*
A	107.5	a
E	98.5	a
B	91.5	a
C	65.0	b
F	58.5	b
D	55.5	b
G	26.5	c
H	25.0	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS (MARGINALES) CON COLORANTES BASICOS

(Azul de Toluidina, Azul de Cresilo Brillante y Azur II)

PULVINUS PRIMARIO

Antes del Estímulo.- Con el colorante Azul de Cresilo Brillante se observaron vacuolas de color verde en todo el pulvinus, registrándose diferencias significativas en las cuatro regiones.

Con el Azul de Toluidina y con Azur II se observaron vacuolas verdes en todo el pulvinus mostrándose diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus .

Después del Estímulo.- Con el colorante Azul de Cresilo brillante se observó un aumento significativo en la cantidad de vacuolas verdes en la zona flexora distal. Las regiones proximales y distales de esta misma zona no presentaron diferencias significativas entre ellas, mientras que en

TABLA XII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	117.5	a
D	110.5	a
C	89.0	b
G	75.0	b
B	34.0	c
E	34.0	c
F	34.0	c
H	34.0	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

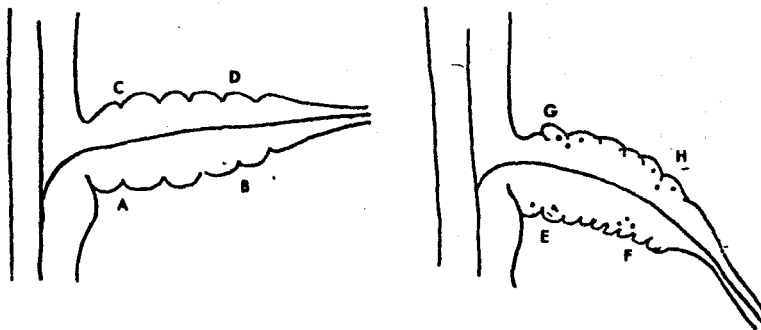


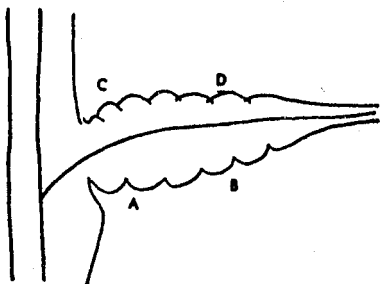
TABLA XIII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	104.5	a
E	89.0	ab
H	85.0	b
D	82.0	b
F	68.0	b
C	47.0	c
G	29.5	cd
B	23.0	d

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

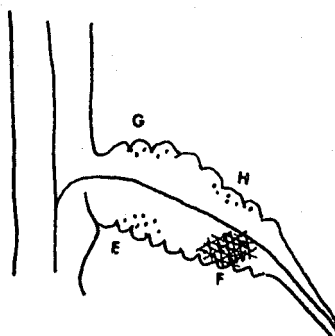


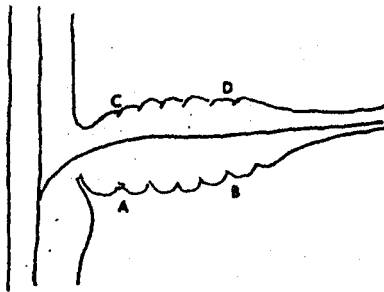
TABLA XIV.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

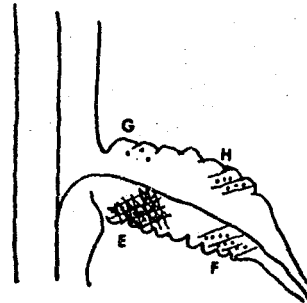
REGION	RANGO	N. S.*
E	103.0	a
H	99.0	a
F	92.5	a
C	65.0	b
A	58.0	b
D	54.5	b
B	28.0	c
G	28.0	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



la zona extensora persistieron las diferencias entre las regiones proximal y distal, detectándose una disminución significativa en la zona extensora proximal respecto al reposo.

Al teñir con Azul de Toluidina se registró un aumento significativo en toda la zona flexora principalmente en la flexora proximal, persistiendo las diferencias significativas entre las cuatro regiones.

Con el colorante Azur II se observó una disminución significativa de vacuolas verdes en todo el pulvinus, principalmente en la zona flexora proximal (Tablas XII, XIII y XIV).

PULVINUS SECUNDARIO

Antes del Estímulo.- Con el colorante Azul de Cresilo Brillante se observaron vacuolas verdes en todo el pulvinus, existiendo diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus.

Con el colorante Azul de Toluidina se observó un mayor número de vacuolas verdes en la zona lateral-interna que en la lateral-externa, existiendo diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus.

Después del Estímulo.- Con el Azul de Cresilo Brillante

se observó un aumento significativo en todo el pulvinus de vacuolas verdes, principalmente en la zona lateral-interna, y de ésta en la región proximal, manteniéndose las diferencias significativas entre las cuatro regiones.

Al ser estimulado el pulvinus teñido con Azul de Toluidina se registró una disminución significativa en toda la zona lateral-interna, principalmente en la región distal.

Con el colorante Azur II no se registraron diferencias significativas en el número de vacuolas taninas en este pulvinus, ni antes ni después de estimularlo (Tablas XV , XVI y XVII).

PULVINUS TERCARIO

Antes del Estímulo.- Con el colorante Azul de Cresilo Brillante se observó mayor número de vacuolas verdes en la zona flexora que en la extensora, existiendo diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus.

Con el colorante Azul de Toluidina no se observaron vacuolas verdes en el pulvinus.

Después del Estímulo.- Con Azul de Cresilo Brillante se registró un aumento significativo en el número de vacuolas teñidas en todo el pulvinus, principalmente en la zona flexora distal, registrándose diferencias significativas entre las cuatro regiones.

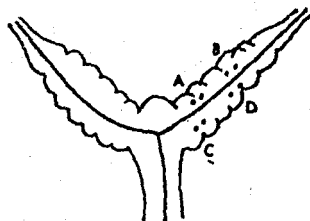
TABLA XV.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
F	109.0	a
B	108.5	a
E	85.5	b
A	79.5	b
C	48.5	c
G	36.0	c
H	32.5	c
D	28.5	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

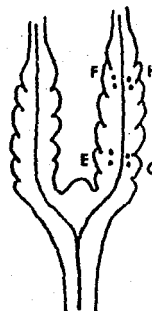


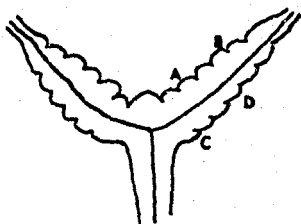
TABLA XVI.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
E	120.0	a
F	99.0	b
G	79.0	c
H	63.0	c
A	61.5	c
B	53.5	cd
D	39.0	d
C	12.5	g

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

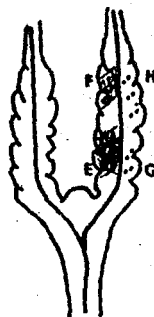


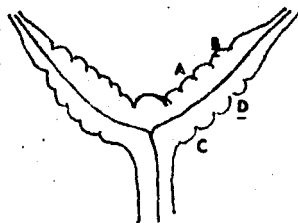
TABLA XVII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

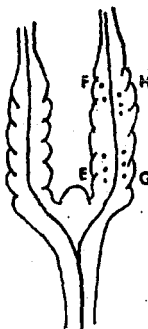
REGION	RANGO	N. S. *
B	122.0	a
A	106.0	a
F	69.0	b
G	69.0	b
E	63.0	b
C	45.0	b
H	44.0	b
D	10.0	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



Al teñir con Azul de Toluidina se observó que el número de vacuolas verdes aumentó significativamente en todo el pulvinus, principalmente en las zonas flexora distal y extensora proximal. Las cuatro regiones del pulvinus no presentaron diferencias significativas entre sí.

Con el colorante Azur II no se registraron diferencias significativas en el número de vacuolas teñidas, ni antes ni después del estímulo (Tablas XVIII y XIX).

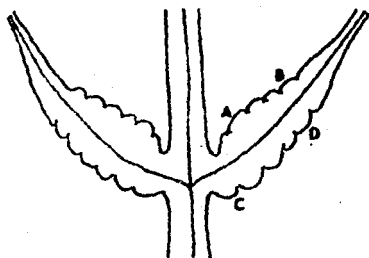
TABLA XVIII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S. *
F	106.5	a
A	100.5	a
B	93.0	a
E	83.0	a
G	61.5	b
H	44.5	b
C	19.5	c
D	19.5	c

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

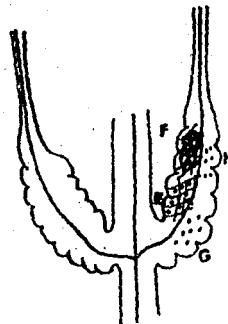


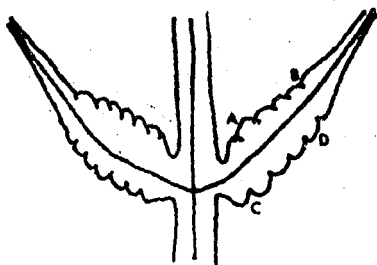
TABLA XIX.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

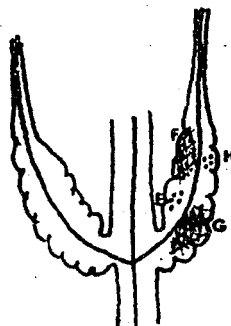
REGION	RANGO	N. S.*
G	105.5	a
F	102.5	a
H	93.5	a
E	83.0	a
A	36.0	b
B	36.0	b
C	36.0	b
D	36.0	b

*P < 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS (MARGINALES) CON COLORANTES ACIDOS
(Azul de Anilina y Azul de Bromofenol)

PULVINUS PRIMARIO

Con los colorantes Azul de Anilina y Azul de Bromofenol antes del estímulo no se observaron vacuolas verdes en todo el pulvinus, sin embargo, después del estímulo se registró un aumento significativo de vacuolas verdes en él, principalmente abarcando toda la zona flexora, aunque para el colorante Azul de Anilina el mayor número de vacuolas se registró en la flexora distal y con el Azul de Bromofenol fué en la flexora proximal (Tablas XX y XXI).

PULVINUS SECUNDARIO

Antes del Estímulo.- Se observaron vacuolas verdes con Azul de Anilina en todo el pulvinus, principalmente en la zona lateral-interna, existiendo diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus.

Después del Estímulo.- Las vacuolas verdes disminuyeron significativamente según se observó con Azul de Anilina principalmente en la zona lateral-interna proximal, sin registrarse diferencias significativas entre las cuatro regiones del pulvinus. Con Azul de Bromofenol no se detectaron diferencias significativas (Tabla XXII).

TABLA XX.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE ANILINA.

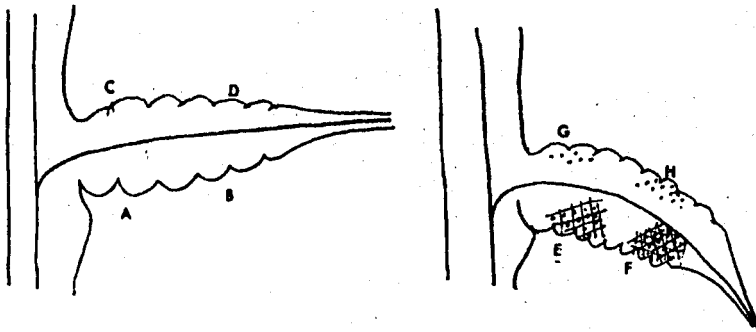
Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
E	102.5	a
G	101.0	a
F	94.5	a
H	70.0	b
A	40.0	c
B	40.0	c
C	40.0	c
D	40.0	c

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA XXI.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S. *
E	112.5	a
F	10.5	a
H	94.0	a
A	44.0	b
B	44.0	b
C	44.0	b
D	44.0	b
G	44.0	b

*P \leq 0.05

ANTES DEL ESTIMULO

DESPUES DEL ESTIMULO

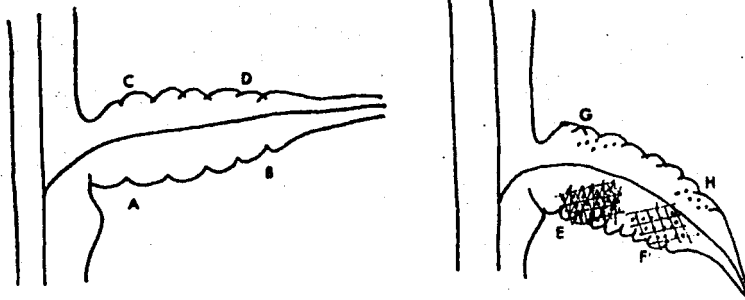


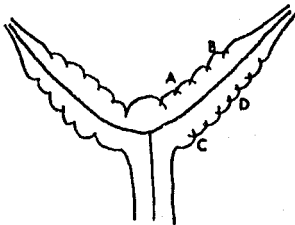
TABLA XXII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

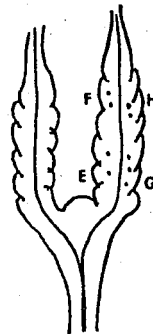
REGION	RANGO	N. S.*
A	112.0	a
C	85.0	b
B	82.0	b
D	71.5	bc
G	57.0	cd
E	47.0	d
H	37.5	d
F	36.0	d

* P < 0.05

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO



PULVINUS TERCARIO

Antes del Estímulo.- Con el Azul de Bromofenol se observaron vacuolas verdes en todo el pulvinus, principalmente en toda la zona flexora, existiendo diferencias entre las regiones de todo el pulvinus.

Después del Estímulo.- Las vacuolas verdes disminuyeron significativamente en la zona extensora y aumentaron en la flexora, principalmente en la región distal.

Con el colorante Azul de Anilina no se registraron diferencias significativas en el número de vacuolas teñidas, ni antes ni después del estímulo. (Tablas XX III).

PREPARACION TESTIGO

En todas las preparaciones testigo las vacuolas observadas fueron color café tanto antes como después del estímulo.

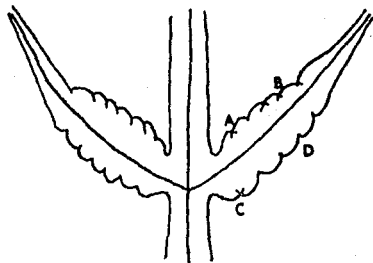
TABLA XXIII.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS de Color Verde Observadas con AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significancia Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	114.5	a
E	103.5	a
F	95.5	a
B	75.0	b
C	50.0	c
D	48.0	c
H	26.0	d
G	16.0	d

* $P \leq 0.05$

ANTES DEL ESTIMULO



DESPUES DEL ESTIMULO

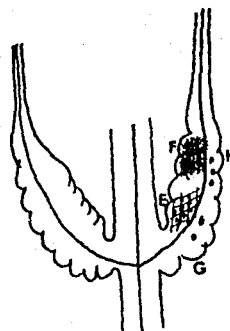


TABLA 1.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	114.0	a
A	112.0	a
G	72.0	b
B	46.0	c
D	46.0	c
E	46.0	c
F	46.0	c
H	46.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 2.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
E	101.5	a
D	95.0	a
H	94.5	a
A	74.5	b
G	62.5	bc
F	53.0	cd
C	35.5	d
B	12.0	e

* $P \leq 0.05$

TABLA 3.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	99.0	a
A	94.0	a
D	86.0	ab
E	70.5	b
G	70.5	b
B	36.0	c
F	36.0	c
H	36.0	c

* $P < 0.05$

TABLA 4.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
H	100.0	a
A	103.0	a
F	98.0	a
G	68.5	b
E	61.5	b
C	61.0	b
B	18.0	c
D	18.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 5.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el colorante AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	115.0	a
D	90.5	b
E	87.5	b
B	63.5	c
A	48.0	c
H	45.0	c
F	39.5	c
G	39.0	c

* $P < 0.05$

TABLA 6.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el colorante AZUL DE CRESILO BRILLANTE.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
D	112.5	a
C	102.5	a
E	88.0	a
A	53.5	b
F	50.0	bc
B	49.0	bc
G	41.0	bc
H	31.5	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 7.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estimulo.

REGION	RANGO	N. S.*
D	106.0	a
C	103.0	a
E	85.5	a
B	59.0	b
F	57.5	b
H	57.5	b
G	30.5	c
A	29.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 8.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café
Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el
colorante AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
E	107.5	a
F	103.5	a
G	78.5	b
C	70.0	bc
H	52.5	cd
D	48.0	d
A	39.0	d
B	29.0	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 9.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café
Observadas para el Pulvinus TERCIARIO con el
colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	105.0	a
D	94.0	a
B	93.0	a
A	90.0	a
G	46.0	b
E	42.5	bc
H	31.5	bc
F	26.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 10.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café
Observadas para el Pulvinus TERCIARIO con el
colorante AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	122.0	a
D	84.5	b
G	76.0	bc
H	73.0	bc
E	68.0	bc
F	48.5	c
A	28.5	d
B	28.0	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 11.- Vacuolas Taninas GRANDES Color Café
Observadas para el Pulvinus TERCIARIO con el
colorante AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
G	106.0	a
H	105.5	a
F	72.5	b
C	67.5	b
A	54.0	b
E	53.5	b
D	42.5	bc
B	26.5	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 12.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	113.0	a
A	103.0	a
B	52.0	b
D	52.0	b
E	52.0	b
F	52.0	b
G	52.0	b
H	52.0	b

* $P \leq 0.05$

TABLA 13.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE CRESILO BRILLANTE.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
F	109.5	a
E	104.5	a
H	72.0	b
C	69.0	b
G	60.5	bc
D	47.0	c
A	42.0	c
B	24.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 14.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	111.5	a
F	77.0	b
H	74.5	b
D	70.5	b
E	67.5	b
C	61.0	b
G	54.0	b
B	12.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 15.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café Observadas para el Pulvinus PRIMARIO con el colorante AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y Nivel de Significación Antes y Después del Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	108.5	a
C	90.0	ab
G	86.0	b
E	78.0	b
F	78.0	b
H	43.5	c
B	22.0	d
D	22.0	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 16.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el
colorante AZUR II.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
D	92.0	a
G	86.0	a
H	83.0	a
E	78.5	a
C	70.0	a
F	66.5	a
A	26.0	b
B	26.0	b

* $P \leq 0.05$

TABLA 17.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el
colorante AZUL DE CRESILO BRILLANTE.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	122.0	a
B	94.5	b
D	85.0	bc
G	67.5	cd
A	60.0	d
F	46.5	de
H	33.5	ef
E	19.5	f

* $P \leq 0.05$

TABLA 18.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el
colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
D	118.0	a
C	102.0	a
E	82.5	ab
F	70.0	b
H	66.0	b
G	53.5	b
A	18.0	c
B	18.0	c

* $P \leq 0.05$

TABLA 19.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus SECUNDARIO con el
colorante AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
F	109.5	a
E	104.0	a
G	91.5	a
C	65.0	b
D	61.5	b
H	45.5	bc
B	26.0	cd
A	25.0	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 20.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus Terciario con el
colorante AZUL DE CRESILO BRILLANTE.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	111.5	a
D	92.0	ab
E	76.0	bc
F	62.0	cd
G	60.5	cd
A	53.5	d
B	46.0	d
H	26.5	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 21.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus Terciario con el
colorante AZUL DE TOLUIDINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
A	116.0	a
B	98.0	a
C	97.0	a
D	72.0	b
E	47.0	c
G	42.5	c
H	40.0	c
F	15.5	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 22.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS, Color Café
Observadas para el Pulvinus TERCIARIO con el
colorante AZUL DE ANILINA.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
C	105.5	a
D	94.0	ab
H	83.0	b
E	78.0	bc
G	61.0	cd
F	46.5	cd
A	30.0	d
B	30.0	d

* $P \leq 0.05$

TABLA 23.- Vacuolas Taninas PEQUEÑAS Color Café
Observadas para el Pulvinus TERCIARIO con el
colorante AZUL DE BROMOFENOL.

Regiones y Rangos en orden de magnitud y
Nivel de Significación Antes y Después del
Estímulo.

REGION	RANGO	N. S.*
G	118.0	a
H	110.0	a
C	65.0	b
D	63.0	b
E	58.0	b
A	38.0	c
B	38.0	c
F	38.0	c

* $P \leq 0.05$

Utilizando los mismos colorantes, en el segundo objetivo se propuso la comprobación de la existencia de correlación entre la histología, la posición anatómica y la velocidad de respuesta de cada pulvinus, tomando en cuenta el número total de vacuolas taninas (verdes mas cafés) observadas. Para tal fin, se efectuaron los siguientes cuestionamientos :

- 1) Si el número total de vacuolas es igual entre los pulvinus antes del estímulo.
- 2) Si el número total de vacuolas es igual entre los pulvinus después del estímulo.
- 3) Si el número total de vacuolas es el mismo en cada pulvinus antes y después del estímulo; y
- 4) Si el número total de vacuolas observadas en cada pulvinus está relacionado a su velocidad de respuesta.

Para contestar estas preguntas se realizó una prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) bajo un diseño Factorial de Dos Factores (Bifactorial; Apéndice 3).

Las diferencias mínimas significativas se analizaron por medio de la prueba de Rango Múltiple de Duncan (Montgomery, 1984).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

VACUOLAS TANINAS GRANDES

Antes del Estímulo.- Se encontraron diferencias entre los pulvinus en cuanto a su número total de vacuolas. El pulvinus primario contiene menos vacuolas taninas que el secundario y terciario. Entre estos últimos no se encontraron diferencias significativas, aunque el terciario presentó siempre ligeramente mayor número real de vacuolas.

Después del Estímulo.- La relación encontrada para antes del estímulo permaneció igual después de estimular los pulvinus.

VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS

Antes del Estímulo.- Con el Azul de Toluidina, Azur II y Azul de Anilina se registró que el pulvinus secundario presentó mayor contenido total de vacuolas.

Entre los pulvinus primario y terciario no existen diferencias significativas en su número total de vacuolas.

Después del Estímulo.- Los resultados con las vacuolas taninas pequeñas obtenidos con los cinco colorantes fueron contradictorios, no distinguiéndose claramente alguna tendencia respecto a qué pulvinus tuvo mayor número de vacuolas.

En cada pulvinus antes y después del estímulo el número total de vacuolas permaneció constante.

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS GRANDES VERDES Y CAFES
 TABLA A.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUR II

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	25909.8332			
A = Actividad	1	383.99997	383.99997	0.9770	4.41
B = Diferentes Pulvinus	2	17564.0833	87.82.041	22.345*	3.55
AB	2	28.87.2500	443.62501	1.1287	3.55
ERROR	18	7074.49988	393.02777		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS GRANDES VERDES Y CAFES
 TABLA B.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	9022			
A	1	3220.16681	3220.1668	13.436*	4.41
B	2	1298.25012	649.12506	2.7084	3.55
AB	2	189.58325	94.79163	0.3956	3.55
ERROR	18	4313.99998	239.66666		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS GRANDES VERDES Y CAFES
 TABLA C.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE TOLUIDINA

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	24529.9581			
A	1	1426.041	1426.041	10.28*	4.41
B	2	14655.08	7327.54	53.36*	3.55
AB	2	5977.0835	2988.54175	21.76*	3.55
ERROR	18	2471.7496	137.31943		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS GRANDES VERDES Y CAFES
 TABLA D.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE ANILINA

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	1706.50			
A	1	468.17	468.17	1.02	4.41
B	2	7965.75	3982.875	8.639*	3.55
AB	2	273.58334	136.792	0.297	3.55
ERROR	18	8298.99994	461.055		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS GRANDES VERDES Y CAFES
 TABLA E.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE BROMOFENOL

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5%
TOTAL	23	18859.33			
A	1	240.67	240.67	1.3907	4.41
B	2	15265.58	7632.79	44.1060*	3.55
AB	2	238.08	119.042	0.6879	3.55
ERROR	18	3115.00	173.055		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS VERDES Y CAFES
 TABLA F.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUR II

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	37685.9582			
A	1	2625.04169	2625.042	13.350*	4.41
B	2	27945.3334	13972.667	71.062*	3.55
AB	2	3576.33344	1788.17	9.094*	3.55
ERROR	18	3539.2497	196.62		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS VERDES Y CAFES
 TABLA G.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	15701.958			
A	1	6501.04163	6501.0463	18.6121*	4.41
B	2	39.5833	19.7916	0.0567	3.55
AB	2	2874.0835	1437.0418	4.1142*	3.55
ERROR	18	6287.2496	349.29165		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS VERDES Y CAFES
 TABLA H. ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE TOLUIDINA

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	7576.4999			
A	1	24.0	24.0	0.1193	4.41
B	2	510.2501	255.12	1.2686	3.55
AB	2	3422.25	1711.12	8.5084*	3.55
ERROR	18	3619.9998	201.11		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS VERDES Y CAFES
 TABLA I.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE ANILINA

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	30715.9999			
A	1	204.1667	204.167	0.78999	4.41
B	2	25519.0001	12759.5	49.3651*	3.55
AB	2	340.3333	170.167	0.6584	3.55
ERROR	18	4652.4999	258.472		

* $P \leq 0.05$

TOTAL DE VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS VERDES Y CAFES
 TABLA J.- ANOVA PARA LOS TRES PULVINUS ANTES Y DESPUES DEL ESTIMULO.
 AZUL DE BROMOFENOL

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F Obs	F requerido 5 %
TOTAL	23	32305.9582			
A	1	108.3749	108.3749	0.4541	4.41
B	2	27322.3334	13661.17	57.2362*	3.55
AB	2	579.0001	289.50	1.2129	3.55
ERROR	18	4296.2498	238.6805		

* $P \leq 0.05$

Por último, a continuación se describe la histología del Pulvinus Secundario como una aportación de este trabajo debido a que no fué encontrada en las investigaciones consultadas.

En el pulvinus secundario se observa la unión de los vasos dorsales y centrales del pecíolo. Este pulvinus tiene una forma cilíndrica en cuyo centro se encuentra el eje vascular, el cual está rodeado por numerosas capas de parénquima cortical, formado por células motoras, las cuales presentan un aparato vacuolar compuesto por una vacuola central y una tanina rodeada por numerosas vacuolas pequeñas.

VI.- DISCUSION .

Según los resultados de esta investigación, se observó que el número de vacuolas obtenido con los cinco colorantes no fué uniforme, ya que existieron variaciones entre ellos, antes y/o después del estímulo, incluso dentro de un mismo grupo de colorantes. Debido a ello, no fué fácil hacer una comparación de los pulvinus y a la vez una interpretación del comportamiento entre ellos mismos. Sin embargo, las diferentes tinciones indicaron ciertas tendencias que permitieron llegar a hacer algunas generalizaciones con respecto a los objetivos planteados. Cabe sin embargo, resaltar la importancia de haber utilizado los cinco colorantes, ya que en un supuesto caso de tratar de comparar resultados de investigaciones separadas, realizadas cada una con un colorante diferente, podríamos llegar a resultados aparentemente distintos que nos dificultarían obtener una conclusión general, o bien nos podrían conducir a conclusiones en apariencia divergentes al intentar explicarnos la relación entre la histología y el comportamiento de los pulvinus y en relación con el movimiento seismonástico en Mimosa pudica.

Al respecto, Toriyama (1967c) trabajó hasta con diez colorantes, mencionando la importancia de los mismos acerca

de la información que podrían brindarnos en cuanto a qué tipo de sustancias químicas contenidas en la vacuola tanina estarían involucradas en el movimiento de respuesta al estímulo (aunque este investigador lo realizó únicamente en el pulvinus primario). Pero en este trabajo se incluyeron los tres pulvinus, por lo cual aumentó de complejidad notablemente en comparación con los trabajos de Toriyama.

Por otra parte, obviamente, sería pensar en esperar resultados idénticos utilizando diferentes colorantes, pues aunque sean de un mismo grupo (ácido o básico) y por lo mismo presenten propiedades químicas semejantes, cada uno de ellos tiene una estructura química y propiedades físicas particulares (Apéndice 1). Ello nos ayuda en parte a explicar la variabilidad de los resultados y en especial las diferencias entre las afinidades de los colorantes básicos y ácidos con respecto al contenido de vacuolas taninas.

ACTIVIDAD DE LAS VACUOLAS TANINAS GRANDES (INTERMEDIAS)

Antes del Estímulo.- Aunque los conteos se basaron en las vacuolas verdes como indicadoras de actividad, siempre se observó la presencia de vacuolas color café antes y después de estimular los pulvinus, al igual que las vacuolas

verdes. Antes del estímulo fué muy apreciable la predominancia de vacuolas cafés, como después del mismo, en las vacuolas predominó el color verde, sucediendo por tanto el fenómeno inverso.

La coloración café de las vacuolas taninas fué igual a la coloración de las vacuolas observadas en la preparación testigo, sugiriéndonos que antes del estímulo la mayoría de las vacuolas taninas no presentan en su interior sustancias que sean afines químicamente a los colorantes, lo cual sí sucede después del mismo.

La presencia de vacuolas verdes antes del estímulo podría interpretarse como la existencia de actividad de algunas células motoras en los pulvinus indicándonos que no hay un reposo absoluto de los mismos, hecho que podría explicarse debido a que los estímulos seismonásticos no son los únicos que afectan a la planta pues se encuentra constantemente expuesta a otro tipo de estímulos ambientales como los cambios de temperatura, vientos rápidos, movimientos lentos, etc.

Después del Estímulo.- Después de recibir el estímulo se incrementó sensiblemente el número de vacuolas teñidas de color verde en todas las zonas de cada pulvinus con respecto a la cantidad observada en el estado de reposo, indicándonos, por tanto, una actividad en el interior del

pulvinus relacionada al movimiento rápido y apreciándose principalmente con los colorantes básicos. Con los colorantes ácidos, aunque se registró un incremento de vacuolas verdes, siguieron predominando las vacuolas cafés.

Además de que las vacuolas tomaron la coloración verde, también redujeron su tamaño y se deformaron presentando menos turgencia.

ACTIVIDAD DE LAS VACUOLAS TANINAS PEQUEÑAS (DEL MARGEN)

Antes del Estímulo.- Con los colorantes ácidos y básicos en los tres pulvinus se encontraron vacuolas verdes y cafés, predominando en número las de color café, el mismo efecto que se observó antes del estímulo con las vacuolas taninas grandes. Sin embargo, siempre se registró mayor número de vacuolas taninas pequeñas que grandes en los pulvinus.

Después del Estímulo.- En el pulvinus primario las vacuolas taninas pequeñas de color verde se incrementaron en número con todos los colorantes.

En el pulvinus secundario tendieron a reducir su número y en el terciario con los cinco colorantes no mostraron tendencia, ya que con el colorante Azul de Cresilo Brillante y Azul de Toluidina incrementaron en número, con los Colorantes Azur II y Azul de Bromofenol tendieron a reducir su

número, mientras que con el Azul de Anilina no se observaron cambios importantes.

REGIONES MAS ACTIVAS DE CADA PULVINUS

El aumento de vacuolas verdes fué registrado en todas las regiones de cada pulvinus, sin embargo, dicho aumento no fué homogéneo en ellos. Los pulvinus primario y terciario presentan su mayor actividad en la zona flexora, en su región proximal.

El pulvinus secundario se distingue porque su mayor actividad la presenta en la zona lateral externa, en su región proximal.

De este modo, las zonas flexoras de los pulvinus primario y terciario y la zona lateral externa del secundario, son al parecer las que presentan la mayor actividad en la transmisión del impulso.

Estos resultados son apoyados por los obtenidos para el pulvinus primario por Abe (1980), donde observó que el acortamiento de las células motoras y los potenciales de acción fueron encontrados principalmente en la mitad inferior del pulvinus, por lo que se sugiere que la mitad superior del pulvinus presenta menor excitabilidad que la inferior.

También concuerdan con los trabajos de Abe y Oda (1976) y de Sibaoka (1969), siendo los primeros quienes determinaron que las células motoras de ambas mitades, superior (extensora) e inferior (flexora) del pulvinus primario son excitables, aunque Sibaoka utilizando electrodos extracelulares registró que los potenciales de acción eran cinco veces mayores en la mitad inferior (flexora) que en la superior. Coincidiendo además con la explicación en Abe (1980) de que la mitad superior es mucho menos extensible que la inferior, debido a que las paredes celulares de su parénquima cortical son más gruesas.

Los resultados de este y de los anteriores trabajos, sugieren que hay una relación estrecha entre la región más activa de cada pulvinus y el tipo de movimiento que ellos presentan, ya que el pulvinus primario que tiene un movimiento de curvamiento hacia abajo en dirección a la fuerza de gravedad, provoca que las células motoras de su zona flexora sufran los mayores cambios, permitiendo mecánicamente el movimiento de flexión hacia abajo y por tanto siendo la más activa.

El movimiento del pulvinus terciario presenta una respuesta semejante a la del primario, pero a diferencia de este el curvamiento lo hace en dirección opuesta a la fuerza de gravedad, siendo también su zona flexora la más

activa para permitir el movimiento de flexión hacia arriba por encima del raquis uniendo ventralmente a las pínulas.

El caso del pulvinus secundario resulta peculiar, pues no presenta movimientos hacia arriba o hacia abajo, sino que posee movimientos de aproximación en un plano horizontal, perpendicular al eje principal de la planta, resultando su zona llamada lateral externa la que presenta mayor actividad y siendo diferente de los otros pulvinus.

AFINIDAD A LOS COLORANTES

El cambio de coloración café a verde podría sugerir que los cambios de afinidad de las vacuolas taninas por los colorantes, se deban a las variaciones fisiológicas que existen en la célula motora durante la actividad de respuesta al estímulo.

Debido a los cambios de tamaño, forma y coloración de las vacuolas taninas después del estímulo, es posible pensar que el proceso excitatorio estudiado electrofisiológicamente (Sibaoka, 1969; Roblin, 1979; Bruria, 1981; Samejima y Sibaoka, 1982 y Abe, 1976, 1980 y 1982), en los pulvinus de Mimosa pudica sea un fenómeno que se desarrolle en la membrana celular, y que coincide con el fenómeno activo del movimiento propagándose a las membranas del

sistema vacuolar, ocasionando cambios de permeabilidad que secundariamente modifiquen el equilibrio osmótico y provoquen así la salida de contenido vacuolar hacia el citoplasma de la célula (Toriyama, 1955W y 1962; Roblin, 1983 y Abe, 1981 y 1985).

Todos estos cambios están caracterizados por presentar flujos transitorios de K^+ , Cl^- , Ca^{++} , H^+ , azúcares y taninos además de los cambios sufridos por las fibrillas que se encuentran en la vacuola central (Toriyama, 1955, 1962, 1967, 1968 y 1970; Samejima y Sibaoka, 1980; Roblin, 1983 y Abe, 1981 y 1985), por lo que puede suponerse que la vacuola tanina está sufriendo cambios importantes en su interior como son los cambios de pH que ocurren por el flujo de iones, sugiriéndonos que los cambios de afinidad de la vacuola tanina a los colorantes principalmente con los básicos después del estímulo se deban a que los cambios producidos dentro de la vacuola tengan una reacción ácida.

Esto puede apoyarse por el hecho de que con los colorantes ácidos hubo tendencia a teñir de verde menor número de vacuolas que los básicos, antes y después del estímulo. De manera general los colorantes ácidos resultan ser menos afines a las sustancias del contenido vacuolar.

Una hipótesis alternativa al flujo de iones y a los cambios sufridos por las fibrillas de la vacuola central,

VII.- CONCLUSIONES .

Los resultados en número y color de las vacuolas tanínicas nos permiten llegar a realizar ciertas conclusiones, las cuales se exponen a continuación :

Los pulvinus presentan diferencias en sus zonas de actividad en respuesta al estímulo, las cuales están ligadas a la histología y al carácter del movimiento de cada uno.

Además de los cambios en coloración de café a verde, las vacuolas tanínicas de los tres pulvinus cambian notablemente en forma y tamaño, por la pérdida de turgencia. Las vacuolas tanínicas pequeñas de las células del margen juegan un papel muy importante durante la respuesta al movimiento rápido, por lo que tanto éstas como las vacuolas grandes participan activamente en la transmisión del impulso.

De acuerdo a las diferencias de actividad en respuesta al estímulo encontradas entre las regiones de los pulvinus, podemos concluir que la zona flexora proximal de los pulvinus primario y terciario y la zona lateral-externa del secundario son las que presentan la mayor actividad en la transmisión del impulso, coincidiendo con la dirección del movimiento rápido de los pulvinus e indicándonos por lo tanto, que existe una estrecha relación entre la zona histológica más activa y el carácter del movimiento que presenta cada uno de ellos.

El cambio de coloración de café a verde sufrido por

cambios de pH, etc. es la que aquí se sugiere, y en la cual las modificaciones sufridas por la célula motora se acompañan de la formación de una sustancia distinta, de fácil degradación, que intervendría en la fisiología del movimiento de la planta y cuyo mecanismo de síntesis-degradación podría involucrar la intervención de enzimas que provocaran en conjunto los cambios de afinidad observados por los colorantes.

Por último, en base a las investigaciones realizadas sobre el pulvinus primario en las cuales se confirma que su zona flexora es la más activa en el movimiento rápido, que concuerda con los resultados observados en este trabajo para el pulvinus primario, y a lo encontrado en los pulvinus secundario y terciario en cuanto a su zona más activa, se detectó que el colorante Azul de Toluidina mostró de manera más evidente dichas zonas, pues con el se encontró que los cambios en el número de vacuolas taninas verdes provocados por el estímulo fueron sensiblemente notables entre antes y después de estimular los pulvinus.

las vacuolas taninas durante el estímulo, sugiere que el proceso excitatorio que se desarrolla en la membrana celular y que se propaga a las membranas del sistema vacuolar ocasiona cambios químicos en las vacuolas taninas acompañados de cambios en la permeabilidad del tonoplasto que provoca los cambios de afinidad a los colorantes básicos, principalmente en el Azul de Toluidina, que mostró de manera más evidente las zonas de mayor actividad en los pulvinus. La reacción de las vacuolas taninas a los colorantes básicos sugiere que las sustancias que se involucran en los cambios ocurridos dentro de la vacuola poseen una característica ácida, sugiriéndonos que los tres pulvinus responden con un mecanismo químico muy similar. Al respecto es importante que se realicen investigaciones empleando técnicas histoquímicas para establecer el tipo de sustancias que se encuentran en el interior de las vacuolas de las células motoras que forman parte del mecanismo de movimiento.

Por otra parte, antes y después del estímulo el número total de vacuolas taninas grandes no fué igual en los tres pulvinus, presentando el primario significativamente menor número de vacuolas. El terciario y el secundario no tienen diferencia significativa. Las vacuolas taninas pequeñas son más numerosas en el pulvinus secundario antes del estímulo, y aunque no fué muy evidente después de aplicarlo,

este hecho nos sugiere que las vacuolas taninas pequeñas tienen mayor participación en la transmisión del impulso en el pulvinus secundario que en los pulvinus primario y terciario, indicándonos que a la vez que la zona del margen es muy importante en el movimiento, puedan existir diferencias de actividad entre las células de la zona intermedia y las del margen.

También se encontró que el número total de vacuolas taninas grandes observadas en cada pulvinus es constante antes y después del estímulo.

Así mismo, se sugiere que el número total de vacuolas de cada pulvinus posiblemente esté en relación a su velocidad de respuesta, pues el pulvinus primario fué el menor de los tres, coincidiendo con lo reportado acerca de que este pulvinus es frecuentemente más lento que los pulvinus secundario y terciario. En base que estos últimos pulvinus no difieren significativamente, este resultado sugeriría una velocidad de respuesta similar entre ellos, lo cual podría verificarse con experimentos electrofisiológicos.

Finalmente, el pulvinus secundario es considerado por el tipo de movimiento que realiza, como el más complejo de los tres, pero también el menos estudiado, siendo necesario realizar mas investigaciones histoquímicas, citológicas y electrofisiológicas de este pulvinus.

VIII.- LITERATURA CITADA .

- Abe T y Oda K (1976). Resting and Action Potentials of Excitable Cells in the Main Pulvinus of Mimosa pudica. Plant and Cell Physiol. 17:1343-1346.
- Abe T (1980). The Shortening and Action Potential of The Cortex in the Main Pulvinus of Mimosa the Main Pulvinus of Mimosa pudica. Bot. Mag. Tokyo 93:247-251.
- Abe T (1981) Chloride Ion Efflux During and Action Potential in the Main Pulvinus of Mimosa pudica. Bot. Mag. Tokyo 94:379-383.
- Abe T and Oda K (1982). Changes in Membrane Resistance during Excitation in the Excitable Cells of Mimosa pudica. L. Sci. Rep. Fukushima Univ. 32:43-48.
- Abe T (1985). Effects of Osmotic Concentrations and IAA on the Rapid Shortening of the Cortex in the Main Pulvinus of Mimosa pudica. Bot. Mag. Tokyo 98:439-447.
- Balmer R and Franks J (1975). Contractile Characteristics of Mimosa pudica L. Plant Physiol. 56:464-467.
- Bidwell RGS (1979). Fisiología Vegetal. AGT (Ed). México. 784 pp.
- Bruria S (1981). The Power of Movement in Plants: The Role of Osmotic Machines in Mimosa pudica. Quarterly Reviews of Biophysics 14,2. 173-222 pp.
Comunicación Personal (Herbario, Facultad de Ciencias UNAM). México.
- Datta M (1957). Vacuoles and Movement in the Pulvinus of Mimosa pudica. Nature 179 (2):253-254.
- Dutt, AK (1957). Vacuoles of the Pulvinus and Mechanisms of Movement. Nature 179 (2): 254.
- Fleurat-Lessard and Rohlin G (1982). Comparative Histocytology of the Petiole and the Main Pulvinus in Mimosa pudica L. Ann. Bot. 50:83-92.
- Guyton AC (1977). Tratado de Fisiología Médica. Interamericana, SA. México.
- Martínez M (1987). Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura. México.
- Montgomery DC (1984). Design and Analysis of Experiments. 2nd (ed), Wiley NY. 358 pp.

- Otsiogo-Oyabi H and Roblin G (1985). Uptake of Glycine by Excised of Mimosa pudica in relation to proton pump activity. *Physiol. Plant* 65:40-44. Copenhagen
- Roblin G (1979). Mimosa pudica : A model for the study of the Excitability in Plants. *Biol. Rev.* 55:135-153.
- Roblin G and Fleurat-Lessard (1983). Distribution of Potassium, Chloride and Calcium and Capacity of Hydrogen Ion Excretion in various parts of the Mimosa pudica Plant. *Annals of Botany* 52:763-768.
- Roblin G (1985). Analysis of the Variation Potential Induced by Wounding in Plants. *Plant Cell Physiol.* 26 (3):455-461.
- Samejima M and Sibaoka T (1980). Changes in the Extracellular Ion in the Main Pulvinus of Mimosa pudica during Rapid Movement and Recovery. *Plant and Cell Physiol.* 2 (3):467-479.
- Samejima M and Sibaoka T (1982). Membrane Potentials and Resistances of Excitable Cells in the Petiole and Main Pulvinus of Mimosa pudica. *Plant and Cell Physiol.* 23 (3):459-465.
- Satter RL (1979). Leaf Movements and Tendril Curling. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, NS Vol. VII. *Physiology of Movements* (ed. H. Haupt and ME Feinlieb). Berlin, Heidelberg, NY: Springer. pp 442-484.
- Schadé JP y Ford DH (1976). *Neurología Básica. Manual Moderno. México.*
- Sibaoka T (1969). Physiology of Rapid Movements in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20:165-184.
- Toriyama H (1955). Observational and Experimental Studies of Sensitive Plants IV. Some Findings on the Structure of the Epidermal System and the Cortex of the Petiole. *Cytologia* Vol. 20.
- Toriyama H (1955). Observational and Experimental Studies of Sensitive Plants VI. The Migration of Potassium in the Primary Pulvinus. *Cytologia* Vol. 20.
- Toriyama H (1962). Observational and Experimental Studies of Sensitive Plants XV. The Migration of Potassium in the Petiole of Mimosa pudica. *Cytologia* 27:431-441.
- Toriyama H (1962). Observational and Experimental Studies of Sensitive Plants XIV. On the Changes in a New Cellular Elements of Mimosa pudica in Diurnal and Nocturnal Conditions. *Cytologia* 27:276-284.
- Toriyama H (1967a). Distribution of Tannin Vacuoles of Mimosa pudica L. *Proceeding of the Japan Academy* 43 (5):384-388.

Toriyama H (1967b). A Comparison of the Mimosa Motor Cell Before and After Stimulation. Proceedings of the Japan Academy 43 (6):541-546.

Toriyama H (1967c). On the Relation Between Tannin Vacuoles and Protoplasm in the Motor Cell of Mimosa pudica L. Proceedings of the Japan Academy 43 (8).

Toriyama H (1968a). Electron Microscope Observation of the Motor Cell of Mimosa pudica L. II. On the Contents of the Central Vacuole of the Motor Cell. Proc. Japan Acad. 44 (9).

Toriyama H (1968b). Electron Microscope Observation of the Motor Cell of the Mimosa pudica L. I. A Comparison of the Motor Cell Before and After Stimulation. Proc. Japan Acad. Vol. 44.

Toriyama H and Komada Y (1970). The Recovery Process of the Tannin Vacuole in the Motor Cell of Mimosa pudica L. Cytologia 36:690-697.

Toriyama H and Satao S (1970). On the Contents of the Central Vacuole in the Mimosa pudica in the Motor Cell. Cytologia 36:356-375.

Watanabe, S (1970). Electron Microscope Studies of Mimosa Pulvinus Cells Before and After Movement. Artes Liberales Iwate Univ. 7:49-51.

Weintraub M (1952). Leaf Movements in Mimosa pudica L. New Phytol. 50:357-382.

APENDICE 1

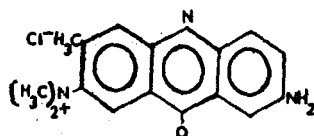
COLORANTES BASICOS

AZUL DE CRESILO BRILLANTE

Usos: Pared Celular, Vacuola, Protoplasma.

Grupo: Oxazin.

Fórmula :



PM = 385.96 gr

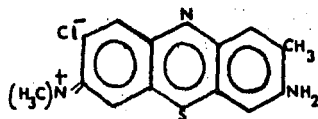
Longitud de Onda máxima: 622 nm

AZUL DE TOLUIDINA

Usos: Pared Celular, Vacuolas Vegetales, Protoplasma.

Grupo: Tionin

Fórmula :

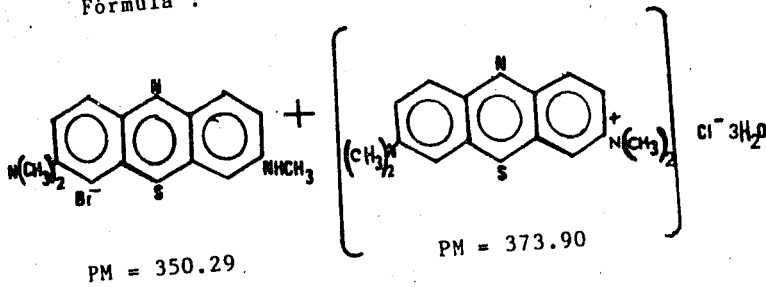


PM = 305.83 gr

Longitud de Onda máxima: 626 nm

AZUR II

Fórmula :



Una Mezcla de Azur I y Azul de Metileno en
iguales cantidades.

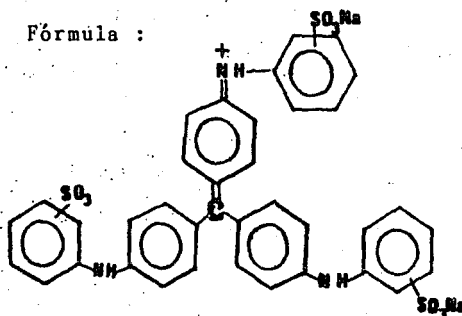
Usos: Diferenciación de RNA y DNA Celular
en Tejido Vegetal.

Longitud de Onda máxima: 657 nm.

COLORANTES ACIDOS

AZUL DE ANILINA

Fórmula :



PM = 799.82 gr

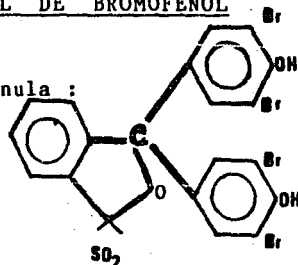
Usos: Tejido Vacuolar.

Grupo: Trifenilmetano.

Longitud de Onda máxima: 600 nm

AZUL DE BROMOFENOL

Fórmula :



PM = 669.98 gr

Usos: Identificación de Proteínas.

Grupo: Tetrabromofenol-sulfonftaleína.

Longitud de Onda máxima: 422 nm

APENDICE 2

ANALISIS DE VARIANZA A LIBRE DISTRIBUCION PARA RANGOS DE
KRUSKAL - WALLIS

El análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis, permite decidir si k muestras independientes proceden de poblaciones estadísticamente diferentes. Al igual que todas las pruebas estadísticas no paramétricas, su modelo no especifica las condiciones de los parámetros de las poblaciones en cuestión, es decir, se trata de una prueba a libre distribución, lo cual si bien implica la suposición de independencia y que se trate de variables continuas, su exigencia es menor comparada con una prueba paramétrica que exige además una distribución normal de la población estadística. Por otra parte, las pruebas no paramétricas permiten su empleo con variables medidas en una escala ordinal, como en nuestro caso, (ordenar o asignar una categoría según rango a las observaciones desde la más baja hasta la más alta.

La prueba de Kruskal-Wallis supone que la variable en estudio tiene una distribución continua como base, por lo cual se requiere al menos, de una medición en escala ordinal. Al calcularla, cada una de las N observaciones es reemplazada por rangos, esto es, todas las observaciones

de las k muestras se ordenan en una sola serie y el puntaje más pequeño es sustituido por el rango 1, el siguiente de más valor por el rango 2 y así sucesivamente.

Posteriormente, se suman los rangos correspondientes a cada una de las k muestras y se procede a determinar si la desigualdad entre las sumas es tan grande que probablemente no proceden de la misma población bajo la hipótesis nula de que: $\mu_0; \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_k$

Para lo cual se calcula el valor del estadístico H , empleado por la prueba, y definido como:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left[\sum_{j=1}^{j=k} \frac{R_j^2}{n_j} \right] - 3(N+1)$$

donde K = núm. de muestras

n_j = núm. de observaciones para $k=j$

R_j = suma de rangos para $k=j$

N = Número total de observaciones

La regla de decisión consistirá en que a un nivel de significación, se rechaza H_0 si el valor de $H \geq H_{\alpha}(k, n_1, n_2, n_3)$ o bien se rechaza H_0 si el valor de $H \geq \chi^2(\alpha, k-1)$, cuando el número de observaciones excede a 5 o el número de muestras es mayor que 3, puesto que en este caso el estadístico H se aproxima a la distribución de χ^2 con $K-1$ grados de libertad, por lo cual la probabilidad asociada, conforme H_0 , de valores tan grandes como el de H observada se puede determinar con la tabla de χ^2 ; cuando no es así, si $k < 3$ y $n < 5$, se cuenta con la tabla de probabilidades exactas para valores de H observada.

Por otra parte, cuando ocurren ligas entre dos o más observaciones, esto es, que tienen el mismo valor, cada puntaje es reemplazado por la media de los rangos con que se encuentra ligado y resulta entonces necesario corregir el valor de H , para obtener H' , mediante :

$$H' = \frac{H}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

donde $T = t^3 - t$, cuando t es el número de puntajes ligados con el mismo valor.

La prueba de Kruskal-Wallis tiene una potencia-eficiencia de 95.5 % cuando es comparada con la prueba paramétrica de análisis de varianza de Fisher para un diseño completamente aleatorizado.

Siegel S (1972). Estadística No Paramétrica. 2ª ed, Trillas. México. 344 pp.

COMPARACION MULTIPLE A LIBRE DISTRIBUCION PARA
SUMA DE RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS

Esta prueba es el equivalente a la prueba paramétrica de diferencia mínima significativa de Duncan, empleada en la separación de medias después del análisis de varianza de Fisher, es decir, permite determinar cuáles muestras proceden de la misma población y cuáles de poblaciones estadísticamente diferentes, mediante el cálculo de las $k(k-1)/2$ diferencias absolutas entre cada par de muestras a examinar.

En nuestro caso, donde k es mayor que 3 y el número de repeticiones excede a 5, la regla de decisión es:

$$u = v \quad \text{si} \quad |R_u - R_v| > q_{\alpha, k, n} \left[\frac{k(k-1)}{12} \right]^{1/2}$$

donde u = efecto del tratamiento u

k = núm. de muestras

n = núm. de observaciones

El valor de q se encuentra tabulado para el número de muestras y de observaciones correspondientes, con un nivel de significación. Para la elección de otras reglas de decisión, se puede consultar a Hollander M y Wolfe AD, (1973). Non Parametrical Statistical Methods. John Wiley & Sons, Inc. USA 503 pp.

APENDICE 3

ANALISIS DE VARIANZA

DISEÑO BIFACTORIAL

Este tipo de diseño se aplica cuando estamos interesados en los efectos de dos o mas variables (tratamientos) simultáneamente. En este diseño nos referimos a las variables como Factores. El experimento en el que se investigan dos o más factores simultáneamente se llama experimento factorial. En ellos no solamente pueden estudiarse los efectos de dos o más factores individuales sino que también puede estudiarse la interacción entre los factores. Se dice que existe interacción cuando la combinación de algún nivel de uno de los factores con algún nivel de otro factor produce un efecto diferente al efecto de alguna otra combinación de niveles de los dos factores. Por ejemplo, en nuestro caso estudiamos el efecto Actividad y Pulvinus en relación al número total de vacuolas taninas, tipo de movimiento y velocidad de respuesta de cada pulvinus. Las variables Actividad (A) y Pulvinus (B) son los Factores. La Actividad ocurre en dos niveles, Antes y Después del Estímulo, y se tienen tres tipos de Pulvinus (1^{rio}, 2^{rio} y 3^{rio}), por lo que se dice que el Factor Pulvinus ocurre en tres niveles. Además si las observaciones en Actividad Antes o Después del estímulo para el Pulvinus Primario tendieran a tener mayor número de vacuolas sobre los otros pulvinus, se dice que existe interacción entre los factores actividad y tipo de pulvinus.

El experimento factorial tiene las siguientes ventajas:

- 1) Puede estudiarse la interacción de los factores.
- 2) Se obtiene un ahorro de tiempo y esfuerzo, ya que el experimento factorial es más económico que dos experimentos de un factor.
- 3) Como los diversos factores se combinan en un experimento, los resultados brindan una panoram más amplio.

Los resultados de un diseño completamente aleatorizado de dos factores pueden presentarse en forma tabular como se muestra en la siguiente tabla:

FACTOR B (PULVINUS)	FACTOR A (ACTIVIDAD)			TOTAL	PROMEDIO
	ANTES	DESPUES	... b		
<u>1^{rio}</u>	X_{111}	X_{121}	... X_{1b1}	$T_{1..}$	$x_{1..}$
<u>2^{rio}</u>	X_{11n}	X_{12n}	... X_{1bn}	$T_{2..}$	$x_{2..}$
<u>3^{rio}</u>	.	.	.	$T_{3..}$	$x_{3..}$
⋮
<u>a</u>	X_{a11}	X_{a21}	... X_{ab1}	$T_{a..}$	$x_{a..}$
	X_{a1n}	X_{a2n}	... X_{abn}		
Totales	$T_{.1.}$	$T_{.2.}$... $T_{.b.}$	$T_{...}$	
Medias	$x_{.1.}$	$x_{.2.}$... $x_{.b.}$		$x_{...}$

Aquí se tienen a niveles del Factor A, b niveles del Factor B y n observaciones para cada combinación de niveles. Cada una de las ab combinaciones de los niveles de un factor A con los niveles de un factor B es un tratamiento. Además de los totales y las medias que se muestran en la tabla, se observa que el total y la media de la ij -ésima celda son $T_{ij} = \sum_{k=1}^n x_{ijk}$ y $\bar{x}_{ij} = T_{ij}/n$ respectivamente. El subíndice i varía desde 1 hasta a y j varía desde 1 hasta b . El número total de observaciones es nab .

Los datos se analizan de la siguiente manera :

1) El modelo. El modelo de efectos fijos para el diseño completamente aleatorizado de dos factores puede escribirse como :

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

$i = 1, 2, \dots, a; \quad j = 1, 2, \dots, b; \quad k = 1, 2, \dots, n$

donde x_{ijk} es una observación típica, μ es una constante, α representa un efecto debido al factor A, β representa un efecto debido al factor B, $(\alpha\beta)$ representa un efecto debido a la interacción de los factores A y B y e_{ijk} representa un error experimental.

2) Suposiciones. a) Las observaciones en cada una de las ab celdas constituyen una muestra aleatoria de tamaño n extraída de la población definida por la combinación particular de los niveles de los factores. b) Cada una de las observaciones está normalmente distribuida y c) Todas las poblaciones tienen la misma varianza.

(Al respecto los datos del número total de vacuolas se tomaron como normalmente distribuidos, ya que se contaron con más de 30 observaciones por cada celda).

3) Hipótesis. Pueden probarse las siguientes :

- 1) $H_0: \alpha_i = 0 \quad i = 1, 2, \dots, a$
 $H_A: \text{no todos los } = 0$
- 2) $H_0: \beta_j = 0 \quad j = 1, 2, \dots, b$
 $H_A \text{ no todos los } = 0$
- 3) $H_0: (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad i = 1, 2, \dots, a;$
 $j = 1, 2, \dots, b$
 $H_A: \text{no todos los } (\alpha\beta)_{ij} = 0$

La Suma de Cuadrados (S.C.) para los tratamientos puede distribuirse como sigue :

$$\text{S.C. tratamientos} = SC_A + SC_B + SC_{AB}$$

Las fórmulas para el cálculo son las siguientes :

$$SC_{\text{TOTAL}} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{ijk}^2 - C$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = \frac{\sum_{i=1}^a T_{i.}^2}{n} - C$$

$$SC_{\text{ERROR}} = SC_{\text{TOTAL}} - SC_{\text{TRATAMIENTOS}}$$

$$SC_A = \frac{\sum_{i=1}^a T_{i.}^2}{bn} - C$$

$$SC_B = \frac{\sum_{j=1}^b T_{.j}^2}{an} - C$$

$$SC_{AB} = SC_{\text{TRATAMIENTOS}} - SC_A - SC_B$$

$$C = \left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{ijk} \right)^2 / abn$$

5) Los resultados de los cálculos para el modelo de efectos fijos bifactorial pueden presentarse como en la siguiente tabla :

Fuente de Variación Factores y sus niveles	g.l. Grados de Libertad	SC Suma de Cuadrados	CM Cuadrados Medios	Fo Fobservada
A tratamientos	a - 1	SC _A	CM _A =SC _A /a-1	Fo=CM _A /CM _E
B tratamientos	b - 1	SC _B	CM _B =SC _B /b-1	Fo=CM _B /CM _E
AB Interacción	(a-1)(b-1)	SC _{AB}	CM _{AB} =SC _{AB} /(a-1) (b-1)	Fo=CM _{AB} /CM _E
Error	ab(n-1)	SC _E	CM _E =SC _E /ab(n-1)	
Totales	abn-1	SC _T		

6) Decisión. Si se cumplen las suposiciones enunciadas al principio y si cada hipótesis es verdadera, puede demostrarse cada una de las razones de varianzas que se muestran en la tabla de arriba siguen una distribución de F con los grados de libertad indicados. En nuestro caso los valores críticos de F (F requerido o esperado) para probar las tres hipótesis fueron 4.41 y 3.55 respectivamente ($F_{.05}[1,18]$ y $F_{.05}[2,18]$). Colocando un asterisco para señalar los tratamientos con diferencia significativa al nivel de significación del 5 %.

Para abundar más al respecto los interesados pueden recurrir a :

- Daniel WW (1985). Bioestadística. LIMUSA. México. 485 pp. Para la Comparación Múltiple de Duncan consultar a
- Montgomery CD (1984). Design and Analysis of Experiments. John Wiley and Sons. 2ª ed. NY 538 pp.