

00381  
rej°  
I

**EFFECTO DE UNA AUXINA  
SINTETICA EN LA DIVISION  
CELULAR DE MAIZ  
DURANTE LA GERMINACION**

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS (BIOLOGIA)  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

M. EN C. ANA MARIA BAIZA MARTINEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	pág
Resumen	i
Introducción	1
•SECCION I ANTECEDENTES	5
A ANTECEDENTES GENERALES	5
1. GERMINACION	5
1.1 Estructura de la semilla	5
1.2 Proceso de germinación	8
1.3 Eventos celulares durante la germinación y crecimiento de las plántulas	9
• Síntesis de proteínas	
• Síntesis de ARN	
• Síntesis de ADN	
• División celular	
2. CICLO CELULAR	14
2.1 Periodo $G_0$	15
2.2 Periodo $G_1$	16
2.3 Periodo $S^1$	18
2.4 Periodo $G_2$	21
2.5 Periodo $M^2$	23
3. CONTROL DEL CICLO CELULAR	25

4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO	27
4.1 Auxinas	27
• Auxinas natural y sintéticas	
4.2 Metabolismo de auxinas	28
• Biosíntesis del AIA	
• Oxidación del AIA	
• Inactivación del AIA por otros procesos	
• Sitios de biosíntesis del AIA	
4.3 Transporte de auxinas	31
4.4 Efectos de las auxinas	31
• Efectos de las auxinas en los ácidos nucleicos	
• Auxinas y división celular	
 B ANTECEDENTES PARTICULARES	 38
• SECCION II ESTUDIO	40
1. HIPOTESIS	40
2. OBJETIVO	41
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
• SECCION III MATERIALES Y METODOS	42
1. MATERIAL BIOLÓGICO	42
2. EQUIPO	42
3. REACTIVOS	43
4. CURVAS DE GERMINACION	43
5. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	43
5.1 Desinfección de los ejes embrionarios	
5.2 Desinfección de las semillas	
6. MEDIO DE CULTIVO	44
6.1 Sistemas de incubación	
7. VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS	47
8. DISECCION DE MERISTEMOS Y ELABORACION DE PREPARACIONES	47

8.1	Diseción de meristemos	
8.2	Elaboración de preparaciones	
9.	DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO	49
10.	DETERMINACION DEL INDICE DE FASES	49
11.	AUTORADIOGRAFIA	50
12.	ESTADISTICA	52
•SECCION IV RESULTADOS		53
1.	ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP EN LA GERMINACION DE MAIZ	53
1.1	Curvas de germinación	53
2.	CINETICA DE LA DIVISION CELULAR EN MERISTEMOS PRIMARIOS DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION	55
2.1	Indice mitótico	55
2.2	Indice de fases	57
3.	EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP SOBRE LA DIVISION CELULAR EN CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION	63
3.1	Indice mitótico	63
3.2	Indice de fases	65
4.	REACTIVACION DE LA DIVISION CELULAR	73
4.1	Autorradiografía de células en mitosis. Ciclo celular	73
4.2	Autorradiografía de células en interfase. Síntesis del ADN	75
5.	EFECTO DEL MCPP SOBRE EL REINICIO DEL CICLO CELULAR	83
5.1	Efecto del MCPP en el índice mitótico	83
5.2	Efecto del MCPP en el índice de fases	84
5.3	Efecto del MCPP en células en interfase	89

•SECCION V	DISCUSION	94
1.	GERMINACION Y EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP	94
2.	CINETICA DE LA DIVISION CELULAR	97
3.	EFECTO DEL MCPP EN LA DIVISION CELULAR	100
4.	REACTIVACION DEL CICLO CELULAR Y EFECTO DEL MCPP	102
•SECCION VI	CONCLUSIONES	107
Referencias bibliográficas		108

## INDICE DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS

Figuras		pág
1	ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNAS AUXINAS	4
2	CORTE TRANSVERSAL DE UN CARIOSIDE DE MAIZ	7
3	GERMINACION DE LA SEMILLA Y MORFOLOGIA DE LA PLANTULA DE <i>Zea mays</i>	10
4	SISTEMAS DE INCUBACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	46
5	MATERIAL BIOLÓGICO	48
Gráficas		
1	EFFECTO DEL MCP P EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE MAIZ	54
2	INDICE MITOTICO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DE MAIZ. (Sistema <i>in vitro</i> )	59
3	INDICE MITOTICO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DE MAIZ. (Sistema <i>in vivo</i> )	60
4	PROPORCION DE LAS FASES DE LA MITOSIS. (Sistema <i>in vitro</i> )	61
5	PROPORCION DE LAS FASES DE LA MITOSIS. (Sistema <i>in vivo</i> )	62
6	EFFECTO DEL MCP P SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR EN MERISTEMOS DE MAIZ. (Sistema <i>in vitro</i> )	66
7	EFFECTO DEL MCP P SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR EN MERISTEMOS DE MAIZ. (Sistema <i>in vivo</i> )	67

Tabla

1	EFFECTO DEL MCPP EN EL INDICE MITOTICO EN MERISTEMOS DE MAIZ INCUBADOS POR DIFERENTES PERIODOS (Sistema <i>in vitro</i> ) (DE)	68
---	--	----

Gráficas

8	EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DEL MESOCOTILO	70
9	EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DE LAS RAICES SEMINALES	71
10	EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DE LA RAIZ PRIMARIA	72

Tabla

2	INCORPORACION DE H <sup>3</sup> -Td EN CELULAS EN DIVISION DE EJES EMBRIONARIOS INCUBADOS POR DIFERENTES PERIODOS (Sistema <i>in vitro</i> )	76
---	--	----

Figura

6	AUTORRADIOGRAFIA DE CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ	77
---	--	----

Gráfica

11	INCORPORACION DE H <sup>3</sup> -Td EN NUCLEOS DE CELULAS DE MAIZ. (Sistema <i>in vitro</i> )	79
----	---	----

Figura

7	NIVELES DE INCORPORACION DE H <sup>3</sup> -Td EN NUCLEOS EN INTERFASE	80
---	--	----

Tabla

3	CANTIDAD DE MARCA RADIATIVA INCORPORADA EN NUCLEOS DE CELULAS MERISTEMATICAS DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ	82
---	---	----



### Gráficas

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 12 | EFFECTO DEL MCPPE EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DEL MESOCOTILO          | 85 |
| 13 | EFFECTO DEL MCPPE EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LAS RAICES SEMINALES | 86 |
| 14 | EFFECTO DEL MCPPE EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ PRIMARIA     | 87 |

### Figura

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 8 | AUTORRADIOGRAFIA DE CELULAS MERISTEMATICAS EN MITOSIS Y EN INTERFASE CON DIFERENTES NIVELES DE INCORPORACION DE H <sup>3</sup> -Td EN SUS NUCLEOS | 88 |
|---|---|----|

### Gráficas

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 15 | ESTIMULO DEL MCPPE EN EL INDICE MITOTICO NO MARCADO   | 90 |
| 16 | ESTIMULO DEL MCPPE EN EL INDICE MITOTICO MARCADO RADIATIVAMENTE   | 91 |
| 17 | EFFECTO DEL MCPPE EN LA INCORPORACION DE H <sup>3</sup> -Td EN NUCLEOS EN INTERFASE DE CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ | 93 |
| 18 | PRESENCIA DE MITOSIS EN LA RAIZ PRIMARIA DE SEMILLAS GERMINADAS DE MAIZ   | 96 |

### Abreviaturas:

ABA	Acido abscísico
ADN	Acido desoxirribonucleico
AIA	Acido indolacético
AMPc	Adenosinmonofosfato cíclico
ANA	Acido naftalenacético
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosintrifosfato
GMPc	Guanosinmonofosfato cíclico
H <sup>3</sup> -Td	Timidina tritiada
MCP	Acido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
NADH	Nicotinamida adenindinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético

## RESUMEN

Los tejidos embrionarios de las semillas maduras se encuentran en estado quiescente o durmiente. Durante la imbibición se activa el metabolismo de las células bajo un programa específico que conduce a la división celular y, consecuentemente, al desarrollo de la plántula. Las auxinas alteran este programa de desarrollo en maíz e inducen a la formación de callo en lugar de los tejidos normales de la plántula. Se ha postulado que este efecto se debe a las alteraciones en el ciclo celular, tal vez producidas por fosforilaciones en las proteínas de la cromatina.

El objetivo de este trabajo es caracterizar el ciclo celular de las células meristemáticas de maíz durante la germinación y determinar cómo, cuándo y dónde se inicia la división celular en estas células, así como la participación de las auxinas en su regulación.

Para ello, se emplearon dos sistemas: a) ejes embrionarios cultivados en un medio nutritivo, y b) semillas germinadas. Ambos se incubaron durante diferentes periodos en presencia y ausencia de una auxina sintética, el ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico (MCP). También se aplicó timidina tritiada para determinar la procedencia de las células. A partir de los ejes embrionarios se disectaron los tejidos meristemáticos presentes en el mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria. Se determinó el índice mitótico en dichos tejidos.

Los resultados señalan que la germinación de maíz, considerada como la protrusión de la radícula, no se realiza por división sino por alargamiento celular.

Al analizar la cinética de la división celular en los diferentes tejidos meristemáticos se encontró que no todos inician este proceso en forma simultánea, sino que parece existir un orden establecido, siendo el mesocótilo el primero en iniciar dicho proceso. Esta división celular se efectúa en forma sincrónica, habiendo

dos poblaciones celulares en el mesocótilo capaces de iniciarla y una sola población en cada uno de los otros meristemos.

En cuanto a la reactivación de las células durante la germinación se encontró que: a) la división celular se reinicia por células detenidas en las etapas  $G_1$  y  $G_2$  del ciclo celular, y b) la síntesis de ADN, considerada en base a la incorporación de marca radiactiva en núcleos en interfase, se inicia antes que la división celular.

La auxina sintética MCPP estimula la mitosis una vez que se presenta, en los diversos meristemos, teniendo un efecto diferencial dependiendo del tejido ("blanco") y del momento (fases del ciclo celular) en que se encuentran las células al momento del tratamiento. Esta auxina tiene un mayor efecto en la región del mesocótilo, actúa preferentemente sobre células provenientes de  $G_2$  y produce un incremento de células en la etapa de profase.

## INTRODUCCION

El estado quiescente o durmiente de las semillas maduras se caracteriza por una suspensión en el crecimiento y un metabolismo a nivel de subsistencia (1, 2). Con el estímulo ambiental adecuado, los procesos bioquímicos que se disminuyeron marcadamente durante la maduración de la semilla se reactivan durante la germinación. Dichos procesos incluyen la hidratación de los tejidos, reintegración de membranas, respiración, síntesis de las macromoléculas, el alargamiento y la división celulares (3).

Un criterio de germinación ampliamente usado es la protrusión de la radícula (4). No obstante, hay que considerar que la emergencia de la radícula no significa en forma obligada una germinación exitosa, en la cual se considera el desarrollo de la plántula (5).

En el caso de las semillas quiescentes, se ha observado que las células embrionarias pueden estar detenidas en etapas específicas del ciclo celular (3, 6), las cuales se liberan de su detención durante o después de la germinación (5).

Se ha considerado que la hidratación del eje embrionario de la semilla seca estimula el metabolismo del eje por una serie de cambios progresivos en los procesos bioquímicos específicos. El eje, al ser disectado del resto de la semilla seca, permite un estudio más preciso de la fisiología y bioquímica que acompaña su hidratación, en ausencia de los eventos ocurridos en otras partes de la semilla, tales como los cotiledones o la aleurona

(7). Gracias a ello, es factible profundizar sobre uno de los procesos antes mencionados: la división celular. Esta división la realizan tejidos específicos como son los meristemos, cuya función *per se* es dividirse y contribuir con nuevas células a los tejidos correspondientes.

Se ha realizado un gran número de estudios tendientes a conocer los eventos implicados en la división celular, así como en su control o regulación (8, 9, 10).

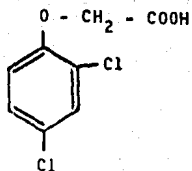
Entre los tejidos vegetales más comunmente usados en estos trabajos se encuentran los meristemos radiculares, los cuales presentan diversas ventajas, como su fácil manejo. Puede obtenerse un "estado constante" de crecimiento del tejido bajo condiciones homogéneas, de manera que las células en proliferación mantienen una duración media del ciclo celular constante, al igual que el índice mitótico y la frecuencia de células en las diferentes etapas del ciclo celular. Al ser la raíz el órgano de absorción y tener alta permeabilidad, se facilita la penetración y eliminación de solutos, lo cual permite probar el efecto de diferentes agentes químicos (11).

Una de las herramientas más empleadas en estudios sobre el ciclo celular es el cultivo de células. En el caso de tejidos vegetales, el medio está constituido por una fuente de carbono y nitrógeno, vitaminas y fitorreguladores, como son las auxinas y las citocininas. Se ha concluido que la relación auxina/citocinina es de gran importancia para inducir y mantener el estado de diferenciación de las células en cultivo, ya que estas sustancias participan en la división y diferenciación celulares (12, 13).

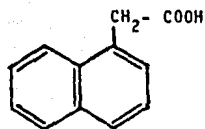
Las auxinas estimulan la proliferación de las células en cultivo. Los compuestos sintéticos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Fig 1) y el ácido naftalenacético (ANA) (Fig 1), han demostrado ser más efectivos, ya que se requieren en concentraciones menores que la auxina natural -el ácido indolacético (AIA) (Fig 1)-, para obtener el mismo efecto (14).

El maíz ha demostrado ser particularmente sensible a la acción de una auxina sintética, el ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico (MCP P o Mecoprop) (Fig 1), cuyo efecto se ha estudiado tanto en el cultivo de tejidos como durante la germinación (14, 15, 16).

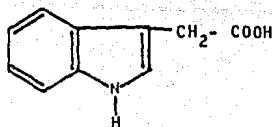
Por otro lado, se ha señalado que las auxinas controlan el proceso de la división celular (17, 18), pero hasta ahora no se conoce el mecanismo a través del cual lo hacen, y los trabajos en relación al tema son limitados (9, 17, 19). Por ello, este estudio pretende contribuir al conocimiento sobre el efecto de las auxinas en la división celular del maíz.



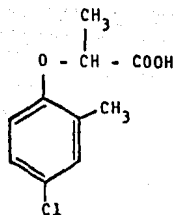
ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO  
(2,4-D)



ACIDO NAFTALENACETICO  
(ANA)



ACIDO INDOL-3-ACETICO  
(AIA)



ACIDO 2-METIL-4-CLOROFENOXIPROPIONICO  
(MCPA)

FIG. 1. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNAS AUXINAS



## SECCION I ANTECEDENTES

### A ANTECEDENTES GENERALES

#### 1. GERMINACION

##### 1.1 Estructura de la semilla

La semilla madura de las angiospermas está integrada, generalmente, por 1) el embrión, que resulta de la fertilización de la óosfera en el saco embrionario por uno de los gametos masculinos del tubo polínico, 2) el endospermo, que proviene de la fusión de dos núcleos polares en el saco embrionario con la otra célula masculina del tubo polínico, 3) el perispermo, en algunas ocasiones la nucela no desaparece y se convierte en este tejido de reserva, y 4) la testa, formada de uno o ambos integumentos alrededor del óvulo (3, 20).

Como se muestra en la Figura 2, el embrión de maíz está embebido en el endospermo hacia la base de la semilla y comprende al eje embrionario y al escutelo. A su vez, el eje está integrado por la raíz embrionaria dirigida hacia el pedicelo y encerrada en la coleorriza; un epicótilo con 5 hojas embrionarias dentro de un coleóptilo (plúmula) y un hipocótilo que está modificado y forma un mesocótilo. Hay también 3 raíces seminales (3, 20, 21).

El término mesocótilo se ha usado extensamente en la literatura para designar al primer internodo. Dicho internodo, abajo de la plúmula, entre el nudo del coleóptilo y el nudo escutelar, es una característica única en las gramíneas.

Cabe señalar que, en forma común, se designa a algunos frutos con el nombre de semillas, como es el caso del maíz; por ello, a través de este trabajo se usará el término de semilla, no obstante de ser en realidad un cariósido.

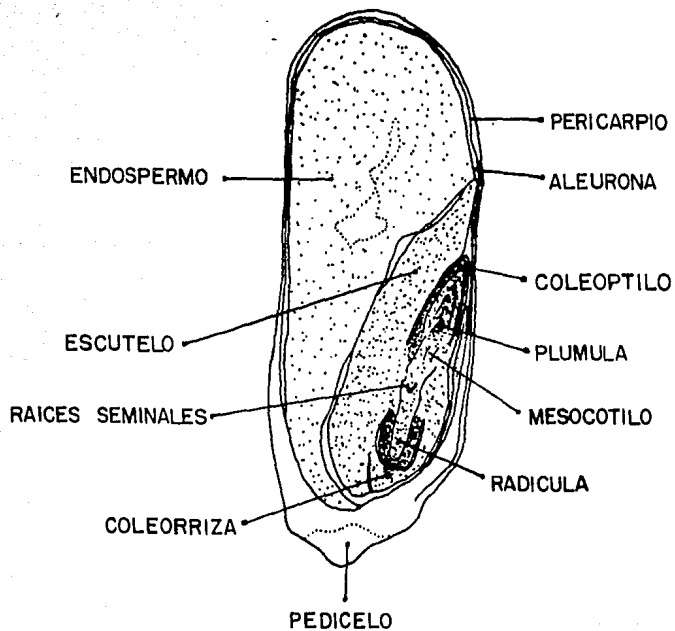


FIG. 2. CORTE TRANSVERSAL DE UN CARIOSPIDO DE MAIZ

## 1.2 Proceso de germinación

La germinación en semillas puede definirse como la serie de cambios morfológicos y bioquímicos que conllevan a la transformación de un embrión en una plántula (20, 21). Por lo tanto, puede considerarse que se atraviesa por dos fases principales:

1. La iniciación del metabolismo activo en el embrión, seguido rápidamente por su crecimiento y diferenciación sostenidos por la utilización del material de reserva.

2. El crecimiento continuo del embrión apoyado por un flujo de productos de hidrólisis de los cotiledones o reserva alimenticia extra-embriónica, tal como el endospermo o el perispermo. Esta fase continúa hasta que la planta se establece como un organismo fotosintético o muere por el agotamiento de la reserva alimenticia (5).

Se ha señalado que varios de los cambios bioquímicos y anatómicos que conducen a la protrusión de la radícula, tales como, la utilización de productos de reserva y crecimiento del embrión, son regulados por los fitorreguladores (19).

El estudio citohistoquímico de la germinación del maíz, señala que, durante la imbibición, el agua entra principalmente a través del pericarpio (22). La carióspside se hincha rápidamente y, de acuerdo con Sass (21), las primeras células en reactivarse son las del meristemo de la raíz primaria y la coleorriza. Después protruye la coleorriza en crecimiento (22) a través del pericarpio, el cual a su vez es penetrado por la radícula reactivada (20) (Fig 3).

Subsecuentemente, señala Picklum (22), la mitosis y el alargamiento celular comienzan en la radícula aproximadamente 24 h después de haberse iniciado la imbibición. Dentro de las 48 h después de la emergencia de la raíz primaria, el primordio de las raíces laterales puede hacerse evidente.

El escutelo permanece embebido en el endospermo en esta típica germinación hipogea y la plúmula misma emerge en una protrusión secundaria; el coleóptilo se eleva hacia la superficie del suelo, principalmente por la actividad de la zona meristemática del primer internodo (20, 22) (Fig 3).

Para que la germinación se complete, la radícula debe expandirse y penetrar las estructuras circundantes; por años ha existido un debate considerable de si esto ocurre solamente por alargamiento celular o si también se requiere de división celular (3, 23, 24).

### 1.3 Eventos celulares durante la germinación y crecimiento de las plántulas

La respiración, la actividad enzimática y de organelos, así como la síntesis del ARN y proteínas, son actividades celulares fundamentales íntimamente involucradas en la terminación de la germinación y la preparación para el subsecuente crecimiento (3, 25).

Se ha supuesto que son tres las vías respiratorias que se activan en la semilla imbibida (la glicólisis, la ruta de la penta-sa-fosfato y el ciclo del ácido cítrico) para la producción de intermediarios en el metabolismo, energía en forma de ATP y poder reductor como NADH y NADPH (2, 3).

Por otro lado, es ampliamente aceptado el hecho de que la síntesis de proteínas es esencial para que se concluya la germinación y para que la radícula emerja. Su inicio, después de la imbibición, es independiente de la síntesis del ARN almacenado (26); sin embargo, antes de que termine la germinación se requiere del ARN sintetizado *de novo*. Ahora bien, la síntesis del ADN en la mayoría de las semillas ocurre solamente después de la germinación y es una parte integral del crecimiento del eje (3), o al menos hay un periodo de muchas horas entre el

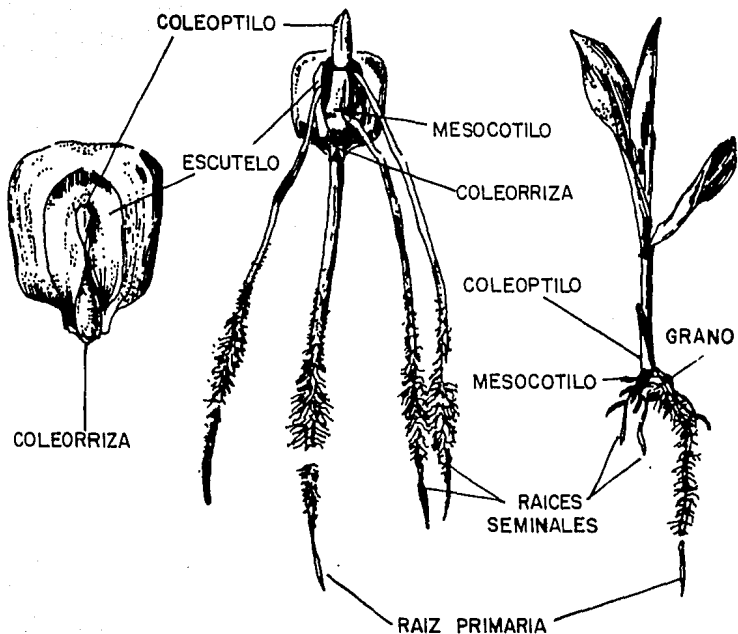


FIG. 3. GERMINACION DE LA SEMILLA Y MORFOLOGIA DE LA PLANTULA DE *Zea mays*

inicio de la actividad metabólica y el comienzo de la síntesis duplicativa del ADN (27, 28).

- Síntesis de proteínas

Los embriones de cereales durante la germinación sintetizan proteínas minutos después de ser colocados en agua a una temperatura apropiada. Esta síntesis se observa dentro de la primera hora de germinación en embriones de centeno (29) y de 15 a 20 minutos en embriones de arroz (30).

Se ha encontrado que (31), en embriones de cebada germinados durante las primeras 4 a 5 h de germinación, la síntesis de proteínas ocurre casi exclusivamente en el escutelo, mientras que hay poca actividad en los componentes del embrión como son la raíz, el nudo o el coleóptilo. Pero después de 5.5 h se observa un incremento de dicha síntesis en todos los componentes del embrión, encontrándose las tasas más altas en el escutelo y en la raíz en desarrollo. Esto se correlaciona con la observación de que la raíz normalmente penetra la cubierta de la semilla después de 6 a 8 h de imbibición. En maíz, la mayor síntesis de proteínas ocurre en el eje embrionario, el cual tiene el mayor contenido de ARNm; en el caso del escutelo, hay una cantidad mínima de este último (32).

- Síntesis de ARN

Dentro de la primera hora, una vez iniciada la imbibición, los embriones de centeno (29) y de trigo (33) inician la síntesis de ARN.

En embriones de arroz parece haber un periodo tardío entre la rehidratación y el inicio de la síntesis de ARN. La síntesis de ARNt se efectúa aparentemente sólo después de 6 h, la de

ARNr entre 6 y 12 h, y la de ARNm entre 12 y 24 h de germinación (30). Esta programación en la síntesis de los diversos ARN varía en embriones de cebada, en los cuales se sintetizan todos ellos durante la primera hora de germinación y la tasa de síntesis de ARN se incrementa muy rápidamente después de 12 h, tiempo en que se inicia el crecimiento y desarrollo visibles del embrión (34).

#### • Síntesis de ADN

Hay reportes que señalan que la síntesis del ADN comienza en las células del embrión sólo después de varias horas de iniciada la imbibición. Su comienzo es variable y al parecer depende de la especie en estudio; va de 4 a 5 h de germinación en embriones de centeno (35), hasta 15 h en embriones de trigo aislados (36). Yoshida y Sasaki (37) encuentran que un primer pico de síntesis de ADN y mitosis en embriones de trigo germinado a 18° C aparece después de 30 h.

En embriones de centeno la síntesis de ADN se inicia en las células en la base del coleótilo, en la coleorriza y en la punta de la raíz, antes que en otras partes del embrión (35).

Por otra parte, se ha señalado que en las semillas maduras secas hay células meristemáticas con diferentes contenidos de ADN, las cuales de acuerdo a la especie se dividirán durante la germinación. Se ha señalado que, de manera particular, en maíz la mayoría de este tipo de células son tetra y octoploides (4C y 8C) (21).

#### • División celular

Existen diversos estudios respecto al momento en que se sucede la división celular durante la germinación y si es o no



posible considerarla como parte de ella.

Se ha concluído que en semillas de lechuga tanto la división como el alargamiento celulares toman lugar entre las 12 y 14 h después de sembrarse a 25° C (23). No obstante, en semillas de maíz el alargamiento precede a la división (21), al igual que en el haba, en cuyo caso la radícula se desarrolla alrededor de 18 h antes de que se observe un incremento en el índice mitótico (38). Un caso contrario es el de *Pinus thunbergii* Parl., en el que la división celular sucede antes que la elongación (39).

Se ha encontrado, también, que los granos de cereales bombardeados con grandes dosis de rayos gamma (para inducir rompimientos cromosómicos), germinan y dan lugar a pequeñas plántulas que pueden crecer, por un máximo de tres semanas, en ausencia de cualquier mitosis y síntesis de ADN (40).

En otras semillas, la diferencia en tiempo entre la división y el alargamiento es cercano, sin embargo, no hay gran evidencia de que la primera anteceda al segundo.

La división celular se realiza mediante eventos específicos, los cuales se han estudiado ampliamente en diversos tipos celulares. Una revisión de los mismos se muestra a continuación.

## 2. CICLO CELULAR

Una de las propiedades fundamentales de la célula es su capacidad de reproducción, mecanismo que involucra: crecimiento, duplicación del ADN y división celular, los cuales a su vez integran lo que comunmente se define como ciclo celular.

Mitchison, en 1971 (41), sugirió que el ciclo de vida de una célula contiene dos ciclos que interactúan entre sí. El ciclo cromosómico, que consiste en la duplicación y la distribución de los cromosomas, y el ciclo de crecimiento, que comprende la duplicación en el tamaño de la célula con todos sus componentes.

Los procesos implicados en el ciclo celular pueden distinguirse estructural o bioquímicamente en fases de actividad reconocidas como periodos del ciclo celular. Howard y Pelc en 1953 (42) propusieron originalmente dichas fases, al considerar que en las células en proliferación es posible distinguir la división por sí misma, que se ha designado como M o D, y la síntesis del ADN, la cual sólo se realiza en una porción limitada de la interfase y que se ha reconocido como fase S. Esto ha permitido localizar un periodo entre M y S, conocido como  $G_1$ , y un periodo entre el término de la síntesis del ADN y la siguiente fase M, llamado  $G_2$ . De esta manera, la interfase está compuesta de  $G_1$ , S y  $G_2$  y comprende, normalmente, 90 % o más del tiempo total del ciclo celular. Estudios posteriores han llevado a la proposición de otra fase del ciclo celular denominada  $G_0$ .

La duración promedio del ciclo celular varía de un tipo celular a otro, y aún dentro del mismo tipo, debido a que las células se dividen a diferentes velocidades. La principal diferencia entre las células que se dividen lenta o rápidamente, está dada por la duración o el tiempo en que permanecen las células en la fase  $G_1$ . En cambio, el tiempo del ciclo a partir del inicio de la fase S hasta la mitosis es muy constante, independiente-

mente de la velocidad de división de la célula (43).

La mayoría de las poblaciones celulares están constituidas por dos clases de células: las que se dividen, es decir, proliferan, y las que no se dividen. Estas últimas, a su vez, tienen dos alternativas. En la primera, pueden entrar a un estado de reposo o quiescencia, en el cual no se dividen ni sintetizan ADN por largos periodos o, dependiendo de las condiciones externas, pueden entrar nuevamente del ciclo celular. En la segunda alternativa pueden diferenciarse terminalmente de manera que, bajo condiciones naturales, no se dividirán nunca (43, 44, 45).

## 2.1 Periodo $G_0$

La fase  $G_0$  se ha definido como un estado en el que se encuentran las células quiescentes o durmientes (43, 46). La mayoría de las células transformadas, sobre todo las transformadas por virus, no pueden entrar a esta fase (43).

A diferencia de las células en  $G_1$ , las células en  $G_0$  sintetizan algunas variantes de histonas (47), el complemento de los ribosomas y el contenido de ARN es diferente (48), y los niveles de calcio y de ARNm para calmodulina son mayores (49). Además, se ha detectado que el grado de condensación de la cromatina es mayor en esta etapa, e incluso se ha propuesto la existencia de un periodo  $G_{02}$  (50).

Se ha señalado, también, que la síntesis de diferentes polipéptidos se requiere para que las células salgan de esta fase; por ejemplo, una proteína de PM=29,000 (51), dos polipéptidos nucleares (52), y la síntesis de una proteína p53 (53), así como la fosforilación de proteínas (particularmente tres polipéptidos mayores (54).

Varios investigadores han indicado que las etapas de  $G_0$  y  $G_1$  son diferentes (55, 56), aún cuando las células en esas fases

tienen el mismo contenido de ADN no duplicado (55). Por ejemplo, las células en  $G_0$  requieren de la adición de componentes exógenos como disponibilidad de factores de crecimiento o nutrientes en el medio, a fin de que emerjan de ese estado, lo que requiere de un tiempo extra, ya que esencialmente necesitan reactivar su maquinaria de síntesis de proteínas. En cambio, las células ciclantes en  $G_1$  tienen ya proteínas activas así como la maquinaria de síntesis de ARNm, después de que salen de mitosis; de esta manera, pueden funcionar más rápidamente los mecanismos que conducen a la síntesis del ADN (55). Es decir, el tiempo requerido para iniciar S es mayor para las células en  $G_0$  que para las células en  $G_1$ .

Epifanova y Polunovsky (56) han evidenciado, a través del análisis de diferentes experimentos, que el estado  $G_0$  no es parte de  $G_1$ , sino que es un estado discreto y separado, con un patrón metabólico único.

## 2.2 Periodo $G_1$

En algunos modelos,  $G_1$  es meramente la diferencia en tiempo entre el ciclo cromosómico y el ciclo de división celular (57), mientras que en otros  $G_1$  involucra procesos esenciales específicos (56) para el inicio de la fase S (46, 58).

Como se mencionó anteriormente, la duración de esta etapa es muy variable. De hecho, se sabe desde hace tiempo que algunas líneas celulares (59), así como, las células en las primeras divisiones de embriones de diversas especies animales (44, 60), no tienen un periodo  $G_1$  detectable. Los experimentos de Prescott y colaboradores han aclarado un poco más acerca del significado de la falta de un periodo  $G_1$  (59, 61).

Se ha propuesto (61) que  $G_1$  en células de cobayo en cultivo, es un periodo de crecimiento que pertenece al ciclo de crecimiento, pero no al ciclo cromosómico. Si la duplicación del ta-

maño de la célula se alcanza tan rápidamente como el ciclo cromosómico (igual a  $S+G_2+M$ ) la célula no tiene un periodo  $G_1$  ( $G_1^-$ ). Por el contrario, cuando el crecimiento es lento, el inicio de la fase S se retarda (debido a la presencia de un periodo  $G_1$ ;  $G_1^+$ ) hasta el momento en que se complete el crecimiento. Esta hipótesis se apoya en observaciones obtenidas al emplear células de cobayo sin un periodo  $G_1$  ( $G_1^-$ ) (59), que pueden inducirse a presentarlo mediante condiciones que hacen más lento el crecimiento celular, sin afectar la longitud del ciclo cromosómico (62).

La regulación del crecimiento de la célula se ha atribuido a la etapa  $G_1$  del ciclo celular, mediante el llamado punto de restricción o punto R (43, 63, 64).

Algunos autores (48, 65) han reconocido dos "subfases" distintas en  $G_1$  de células animales en proliferación. Se ha señalado que, al salir de mitosis, las células permanecen con bajos contenidos de ARN y se ubican en el compartimiento  $G_{1A}$  (localizado en  $G_1$  temprano), a partir del cual no pueden entrar directamente a la fase S. Se necesita de un incremento en el contenido de ARN a un nivel crítico (es decir, que pasen al compartimiento  $G_{1B}$ ) para que las células sean capaces de iniciar la duplicación del ADN (48). Se ha sugerido que las células se detienen en el primer punto de  $G_1$  debido a la falta de factores de crecimiento, ya que las células en ese punto son sensibles a inhibidores del metabolismo del ARN, y en el segundo punto se detienen debido a la falta de nutrientes, pues las células, en este caso, no son sensibles a dichos inhibidores (65).

Se ha indicado, también, que las células detenidas en  $G_1$  es decir, quiescentes (en  $G_{1O}$ ), tienen una marcada disminución en el contenido de ARN celular (debido a una disminución en la síntesis) en comparación con el estado  $G_{1A}$ ; además, la estructura de su cromatina está alterada. De este modo, el estado de quiescencia ( $G_{1O}$ ) es diferente del estado  $G_{1A}$  de células cicantes o de células detenidas en  $G_{1A}$  por falta de suero (48).

Otros autores (55) han dividido en cuatro subsecciones al intervalo de  $G_0$  a S en células animales detenidas en  $G_0$  estimuladas a proliferar. Primero entran a un estado competente (C), después de cierto tiempo llegan a un punto que denominan V, en el cual son similares a las células ciclantes que provienen de mitosis. Posteriormente alcanzan el punto de control R o de restricción, después del cual no se requiere de factores de crecimiento, ni de transcripción ni de una rápida traducción (66). Entre R y el inicio de la fase S se organiza la maquinaria para la síntesis del ADN; una vez concluida ésta, el resto de las fases continúa independientemente de los controles fisiológicos externos.

Por otro lado, durante  $G_1$  se inicia el crecimiento de la célula, representado por un aumento en el tamaño del núcleo, del número de ribosomas y de un incremento en el metabolismo del ARNr. También hay un aumento en la síntesis de los otros ARN y en los niveles de las diferentes polimerasas (43, 44).

Se ha demostrado una gran actividad de síntesis de proteínas en este periodo. Entre estas se encuentran, por ejemplo, la calmodulina (49), la ornitina descarboxilasa (43), cuyo ARNm alcanza un máximo incremento en  $G_1$  (58), la proteína p53 (53), varias proteínas citoplásmicas (descritas en 43) y diferentes enzimas que funcionan en el aprovisionamiento de los precursores del ADN (44). También, en  $G_1$  se ha detectado una síntesis basal de histonas (al igual que en las otras fases del ciclo celular) (67) y la fosforilación de la histona  $H_1$  (68).

Además, en  $G_1$  hay cambios en la morfología de las células, los cuales se realizan durante todo el ciclo celular (69; se ha realizado una revisión en 46).

### 2.3 Periodo S

En esta fase se realiza la duplicación del genoma por medio

de las unidades de duplicación o duplicones, cuyo número varía en los diferentes organismos.

La longitud del periodo S parece estar determinada por el tamaño de los duplicones (44) o por el número de sitios de iniciación que operan (70), más que por las diferencias en la tasa de movimiento de la horquilla de duplicación (44).

Existe un orden temporal de duplicación dentro de los diferentes segmentos de un solo cromosoma, el cual se conserva a través de las divisiones sucesivas. Se sabe que en células eucariontes el punto de inicio para la duplicación es fijo y constante y siempre procede con el mismo orden. A su vez, los patrones de duplicación secuencial se correlacionan con el contenido de bases, ya que las regiones eucromáticas ricas en G-C se duplican durante S temprana y aquellas heterocromáticas ricas en A-T lo hacen durante S tardía. El número de estudios realizados al respecto es amplio (algunos de ellos analizados por 71).

La maduración del ADN cromosómico es un proceso único en eucariontes y se refiere a la unión de duplicones nacientes para formar grupos de éstos, los cuales, al unirse producen un ADN naciente de tamaño cromosómico (10). Se ha demostrado que la cantidad de timidina endógena en células en S es un factor responsable de dicha maduración (72). En plantas, deoxitimidina quinasa y la deoxitimidina monofosfato quinasa proveen los precursores para la deoxitimidina trifosfato; se ha sugerido que la alta actividad de estas enzimas durante S tardía y G<sub>2</sub> temprana podría incrementar la poza celular de deoxitimidina trifosfato, favoreciendo la maduración del ADN cromosómico (73). En animales, la expresión del gene de la timidina quinasa está altamente acoplado en el límite G<sub>1</sub>/S (74).

Las enzimas necesarias para la síntesis del ADN son diversas, y varias de ellas, como la timidina quinasa, ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa se incrementan marcadamente en el límite G<sub>1</sub>/S (43, 58, 75, 76).

En organismos superiores se ha encontrado un complejo multiproteico denominado "replitasa" que contiene tanto ADN naciente como un número considerable de enzimas que son requeridas para la síntesis del ADN (75, 77). Este complejo se ha encontrado en células en S pero no en células en  $G_1$ , y su aparición se correlaciona con el tiempo en el cual se dispara la síntesis del ADN (77), por lo que se ha sugerido que el paso final que conduce al inicio de la duplicación es la producción de una de estas enzimas. Realmente, varias de ellas aumentan notablemente al mismo tiempo que se inicia la síntesis del ADN (78). Su aparición no es dependiente de la síntesis del ADN, a diferencia de las histonas, las cuales se sintetizan coordinadamente con el ADN (79).

Como ya se mencionó, la síntesis de histonas, con algunas excepciones, está restringida a la fase S. Sólo durante esta etapa, las secuencias del ARNm para histonas (al menos las del octámero) se encuentran en cantidades significativas en el núcleo y en el citoplasma (80); asimismo, hay una activa síntesis de dichos ARNm (81). Se ha demostrado que la expresión de los genes para histonas ( $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$  y  $H_4$ ) depende de la entrada de las células en la fase S (82). En humanos, la expresión del gene para la histona  $H_3$  (83) y para la  $H_1$  (84) está acoplada con la fase S.

También la fosforilación de histonas es continua a través de S, siendo fosforilada la  $H_1$  en dos sitios adicionales a los de  $G_1$  (68). La fosforilación de esta histona a través del ciclo celular se ha correlacionado con la síntesis del ADN (85) o con la condensación cromosómica (68); por ejemplo, en células animales un decremento en la misma ocasiona una síntesis incompleta del ADN y un defecto en la condensación de los cromosomas (86). Cabe señalar que la histona  $H_2$  se fosforila durante todo el ciclo celular (68).

Numerosos estudios han señalado que la síntesis de proteínas es necesaria para la continuidad de la síntesis del ADN, y Prescott (44) y Baserga (43) han puesto énfasis en algunas de



ellas.

## 2.4 Periodo G<sub>2</sub>

Esta fase representa el tiempo que la célula requiere para sintetizar los elementos necesarios para la condensación cromosómica y la construcción del aparato mitótico.

El tránsito de células a través de G<sub>2</sub> puede bloquearse en diferentes tipos celulares de animales (87) y de vegetales (88, 89), lo que demuestra que este periodo contiene un punto en el cual el ciclo puede ser interrumpido sin detrimento en la viabilidad de la célula. A su vez, se han encontrado células no cíclicas con una cantidad de ADN correspondiente a G<sub>2</sub>. Esto sugiere la existencia de un segundo punto de restricción en esta fase.

Numerosos reportes han confirmado que los inhibidores de la síntesis del ARN y proteínas detienen la progresión de las células en este periodo; los resultados encontrados indican que la transcripción del ARN se requiere al menos dentro de G<sub>2</sub> medio y tardío o incluso en la profase temprana (43, 44).

Se ha indicado, también, que en G<sub>2</sub> hay síntesis de proteínas específicas necesarias para que las células entren en división; dentro de ellas se localizan las requeridas para la condensación cromosómica y la construcción y funcionamiento del aparato mitótico. En *Physarum* se han identificado tubulinas que se incrementan cerca de 30 veces antes de la mitosis (90) y en *Chlamydomonas* la  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, se sintetizan preferencialmente antes y durante la mitosis; los ARNm correspondientes se acumulan coordinadamente durante la etapa de predivisión del ciclo celular y alcanzan niveles máximos antes o durante la división (91).

Se ha descrito (92) la existencia de proteínas que intervienen

en la condensación de los cromosomas, las cuales se han denominado "factores mitóticos", que son del tipo de las no histonas con gran afinidad por la cromatina y cuya acumulación se efectúa en  $G_2$ . En telofase, estos factores son inactivados por otros llamados "inhibidores de los factores mitóticos" que permanecen activos hasta la fase  $G_1$ , por lo que se consideran importantes en la descondensación cromosómica.

La sugerencia de que algunos genes deben expresarse para la progresión a través de  $G_2$ , se confirma mediante la aparición de mutantes específicos de esta etapa, por ejemplo, los sensibles a la temperatura (93). En *Aspergillus* el producto de un gene en particular se requiere específicamente en  $G_2$  tardío para la iniciación de la mitosis. Dicho gene, que es capaz de inducir una mitosis prematura aún en células bloqueadas en interfase, codifica para una proteína quinasa. Se ha propuesto (93) que durante la interfase la actividad de la quinasa es baja, por lo que no se realiza la mitosis; sin embargo, en  $G_2$  la expresión del gene se incrementa en respuesta a señales que indican el cumplimiento de prerequisites para la mitosis; como consecuencia, las proteínas críticas blanco se fosforilan originando la formación del huso acromático, la condensación cromosómica y la entrada de los núcleos a mitosis.

Varios autores han considerado que la fase  $G_2$  es indispensable para las células tanto de animales como de vegetales. En estos últimos, bajo ciertas condiciones experimentales, se ha logrado acortar  $G_2$  hasta en un 70% de su duración, acompañado de un alargamiento en el periodo S precedente (94). Esta relación entre alargamiento de S y acortamiento de  $G_2$  sugiere que los ciclos cromosómico y de crecimiento están interconectados en  $G_2$ , como se ha propuesto para vegetales (95, 96).

La duración de  $G_2$  puede estar regulada, entre otros factores, por el tamaño de la célula. Esta proposición se apoya en resultados obtenidos en meristemas de *Allium* (95, 96). El grupo de Navarrete y colaboradores (97) han confirmado que dicha regulación opera durante el crecimiento de la célula, contribu-

yendo a mantener la variabilidad del tamaño celular dentro de ciertos límites. Estos autores han encontrado que junto con la alta variabilidad de  $G_2$ , hay una reducción de la variabilidad del tamaño celular durante este periodo.

Otro suceso importante durante la fase de  $G_2$  es la realización de un proceso de reparación del ADN (98, 99). Se ha demostrado ampliamente que diferentes agentes físicos o químicos producen aberraciones cromosómicas, y se ha postulado que cuando la frecuencia basal de lesiones en el ADN que llegan a  $G_2$  se ha incrementado por agentes clastogénicos, la inhibición del mecanismo de reparación  $G_2$ -profase debe incrementar fuertemente la producción de aberraciones cromosómicas (99, 100).

## 2.5 Periodo M

Una vez que la duplicación del ADN se ha realizado y se ha cubierto un periodo  $G_2$ , las células entran a mitosis o meiosis, en donde sufren grandes cambios estructurales. Durante esta fase se hace necesaria la presencia del aparato mitótico que asegura la separación equitativa de los cromosomas, a su vez, se requiere de factores relacionados con la condensación y descondensación de la cromatina y con la retracción y reestructuración de la envoltura nuclear.

Algunos experimentos recientes han evidenciado que diversos sucesos mitóticos pueden ocurrir en forma periódica independientemente de aquellos ocurridos en  $G_1$  y S. En células de animales bloqueadas en estas fases, es posible inducir condensación cromosómica, desaparición del nucleólo y rompimiento de la envoltura nuclear, los cuales se acompañan de una acumulación de fosfoproteínas específicas de la mitosis (101).

La tasa de síntesis de proteínas se reduce marcadamente durante la mitosis, a un nivel que es aproximadamente el 20 % de la tasa que se elabora en células en interfase; aparen-

temente, la disminución se debe a una inhibición a nivel de iniciación de la traducción, de tal manera que los ribosomas no pueden unirse al ARN. Las proteínas cromosómicas no histonas son una excepción, ya que su síntesis continúa durante mitosis en una proporción similar a la de la interfase (43).

La tasa de síntesis del ARN disminuye rápidamente en profase tardía y la síntesis de todos los ARN se detiene antes de llegar a metafase (43, 44), con excepción de la síntesis continua de algunos ARN 4S y 5S durante la mitosis. Esta reducción en la transcripción probablemente refleja dos cambios que pueden seguirse morfológicamente durante esas etapas: la condensación cromosómica, relacionada con la inactivación de la cromatina, y la desaparición del nucleólo, indicando el cese de la síntesis del ARNr, cuya sola interrupción podría dar cuenta de la mayoría de la inhibición detectada en metafase (8).

Durante la mitosis, la histona  $H_1$  es fosforilada adicionalmente, mientras que la histona  $H_3$  se fosforila por primera vez durante el ciclo celular (68).

### 3. CONTROL DEL CICLO CELULAR

La regulación de la proliferación celular se ha atribuido a la etapa  $G_1$  del ciclo celular (43, 63, 64).

*In vivo*, la mayoría de las células quiescentes tienen un contenido de ADN  $G_1$ , al igual que las células en cultivo detenidas en  $G_1$ . En cultivo, las células normales se detienen en esta etapa bajo una variedad de condiciones que impiden o disminuyen la proliferación: privación de nutrientes (debido a la disminución de factores de crecimiento), alta densidad celular y parcial inhibición de la síntesis de proteínas; esas células regresan al estado de proliferación una vez que se les proporciona un medio completo. Este punto de detención se conoce como punto de restricción o punto R (63).

Se ha investigado sobre la naturaleza bioquímica del punto R. En células de animales (3T3), el punto R se localiza 2 h antes de la fase S; antes de este punto (primera parte de  $G_1$ ) las células requieren de transcripción y de una rápida síntesis de proteínas, tanto como de un factor de crecimiento para moverse e iniciar la síntesis del ADN. En contraste, las células situadas antes del punto R son independientes de estos tres hechos (66). La síntesis *de novo* de varias enzimas como la timidilato sintetasa y la timidina quinasa ocurre después del punto R (78) y aparentemente está bajo el mismo control que el inicio de la síntesis del ADN (55).

Ya que al inhibir la síntesis de proteínas totales se bloquea el tránsito de las células a través de  $G_1$  temprano, se ha propuesto que esto se debe a que se necesita de una o varias proteínas en particular. Al respecto, se han caracterizado elementos proteicos necesarios para el inicio de la síntesis del ADN, y se han encontrado entre ellos una proteína "R", lábil y cuya síntesis se inicia al comienzo de  $G_1$  (102). Esta proteína de 53 Kd es muy estable en células 3T3 transformadas y lábil en células normales (103).

Se ha propuesto la existencia de otro punto de control en la fase  $G_2$  temprana, en la cual se requiere de la síntesis de proteínas específicas para que las células entren a mitosis (104).

La hipótesis de que hay dos puntos principales de control del ciclo celular ha recibido apoyo de los datos obtenidos por Van't Hof (10). Si las células meristemáticas de haba se privan de carbohidratos, éstas detienen su ciclo en  $G_1$  o  $G_2$ , pero no en S o M. Esto sugiere que una vez que se inicia la fase de síntesis del ADN o de la mitosis, normalmente se completan aún cuando la célula sea privada de una fuente exógena de carbohidratos. Al suministrar de nuevo esta fuente, las células entran a sus fases respectivas, después de un periodo "lag". De esta manera, cada célula está sujeta a un control en  $G_1$  y  $G_2$ .

Además, se ha propuesto (105) que hay un punto menor de control en la profase temprana, ya que si se inhibe la síntesis de proteínas en esta fase, se altera la progresión de la mitosis y el núcleo puede regresar a su estructura interfásica.

Giménez-Martín y colaboradores (106), han comprobado la existencia de puntos de control en  $G_2$  y profase señalando que la inhibición de la síntesis de proteínas en  $G_2$ , ocasiona un severo retraso en la entrada de las células a mitosis y dicha inhibición en profase produce un alargamiento de la misma.

A través del tiempo, se ha indicado la existencia de diversos factores que "controlan" la proliferación celular; algunos de ellos, de manera general, son: ATP, AMPc, GMPc; tamaño nuclear y celular; síntesis y cantidad del ARNr; fosforilación de proteínas ribosomales; fosforilación y defosforilación de histonas; síntesis o fosforilación de no histonas; ornitina descarboxilasa y calmodulina, entre otros; la gran mayoría estudiados en células de animales (43, 46).

En vegetales, entre los compuestos que se han relacionado estrechamente con el proceso de división celular, se encuentran los llamados fitoreguladores del crecimiento.

## 4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO

El control del crecimiento vegetal está regulado por las hormonas vegetales o fitorreguladores, los cuales pueden definirse como aquellas sustancias orgánicas que son activas en concentraciones mínimas (del orden de  $10^{-6}$  M o menos), que se sintetizan en una parte de la planta, y que generalmente se trasladan a otro sitio, en donde producen las respuestas bioquímicas relativas al crecimiento y diferenciación de los tejidos y órganos, con los cuales se ponen en contacto (107).

Existen diferencias básicas entre las hormonas de animales y de vegetales en cuanto a su síntesis y actividad. Para las primeras, generalmente su biosíntesis y sitio de acción son específicos, en tanto que para los vegetales no siempre es posible diferenciar el sitio de síntesis y el blanco de acción. Las hormonas de animales presentan efectos muy específicos; en cambio, en las plantas el efecto puede consistir en un amplio intervalo de respuestas, lo que dependerá del órgano o tejido sobre el que actúan estas sustancias. Por ello, a las hormonas vegetales se les ha llamado "reguladores del crecimiento" (108).

Considerando la naturaleza química y los efectos fisiológicos de estos reguladores, se les ha agrupado en 5 clases: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico.

### 4.1 Auxinas

De manera general, las auxinas promueven el alargamiento celular, inhiben el crecimiento de la raíz y la formación de yemas laterales, fenómeno denominado dominancia apical. Intervienen en la diferenciación de traqueidas, estimulan la división celular y promueven la formación de callos. Están involucradas en el metabolismo de carbohidratos, ácidos nucleicos y síntesis de proteínas (109).

- Auxinas natural y sintéticas

El ácido indolacético (AIA) es la principal auxina natural en plantas superiores. Sin embargo, hay muchos compuestos sintéticos que pueden llamarse auxinas, ya que su acción fisiológica es similar a la del AIA.

Las auxinas sintéticas son químicamente diversas, pero por conveniencia pueden reunirse en 5 grupos principales: ácidos indólicos (por ejemplo ácido indolpropiónico); ácidos naftalénicos (ácido naftalenacético); ácidos clorofenoxiacéticos o propiónicos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); ácidos benzoicos (ácido 2,4,6-triclorobenzoico) y derivados del ácido picolínico (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (107).

Las auxinas incluidas en los grupos de los ácidos clorofenoxi, principalmente, además del benzoico y el picolínico, se emplean como herbicidas selectivos en la agricultura (107, 110).

#### 4.2 Metabolismo de auxinas

Como se sabe que la concentración de auxina disponible en los tejidos puede tener un efecto determinante sobre el crecimiento y la diferenciación celular, es evidente la importancia de los factores que limitan dicha concentración. Estos incluyen síntesis, destrucción, inactivación (por otros procesos que no sea la destrucción de la molécula), y la regulación del transporte entre tejidos y órganos (108, 111).

- Biosíntesis del AIA

Se ha señalado que el triptofano es el precursor para la biosíntesis de AIA a través de dos vías probables. En una, el tript-



tofano, mediante una reacción de transaminación, se convierte en ácido indolpirúvico, que a su vez es descarboxilado para dar lugar a indolacetaldehído que se oxida en ácido indol-3-acético. La otra vía involucra una descarboxilación del triptofano para formar triptamina, que por oxidación se convierte en 3-indolacetaldehído, el cual a su vez se oxida en ácido indol-3-acético (107, 111).

Puede haber diferentes vías de biosíntesis de AIA a partir de triptofano en diversas especies (111), pudiendo operar más de una de ellas en una especie u operar diferencialmente dependiendo de la parte de la planta o la etapa del crecimiento (107).

#### • Oxidación del AIA

La destrucción de la auxina se realiza por dos procesos oxidativos básicos: 1) reacción enzimática, y 2) foto-oxidación. En el primero, actúa la AIA oxidasa, que cataliza el rompimiento del AIA, para producir 3-metileno-oxindol y el indolaldehído. La actividad de esta oxidasa se incrementa por monofenoles y se reduce por orto- y para- difenoles, así como por polifenoles. Se ha encontrado que el AIA en solución acuosa se descompone rápidamente en presencia de la luz. Esta foto-oxidación se acelera por la riboflavina, la eosina y otros colorantes fluorescentes. Los productos aparentemente son idénticos incluyendo el 3-metiloxindol y 3-indolaldehído, junto con otros compuestos no identificados (107).

#### • Inactivación del AIA por otros procesos

Además de los dos procesos de degradación mencionados anteriormente, el AIA puede inactivarse por la formación de complejos hormonalmente inertes. De este modo, el AIA es esterificado por enzimas para producir indol etil acetato. Similarmen-

te, se ha reportado la formación de conjugados entre AIA y varios azúcares, los cuales producen compuestos como el indol acetilarabinosa, indolacetilglucosa y el AIA-mioinositol y entre AIA y proteínas (108). Se ha sugerido que las auxinas conjugadas pueden considerarse como formas de almacenamiento o detoxificación (112), o bien, pueden ser responsables de eliminar un exceso de la auxina endógena (113).

#### • Sitios de biosíntesis del AIA

Hay diversos estudios sobre la distribución de la auxina dentro de la planta; sin embargo, debe recordarse que el nivel de la auxina en un órgano dado refleja un balance entre síntesis, metabolismo y transporte dentro y fuera del órgano (111).

La auxina se sintetiza en cantidades relativamente grandes, solamente en unos cuantos centros localizados, pero es transportada a través de todos los tejidos vivos de la planta. Las puntas de tallos, incluyendo particularmente las hojas jóvenes, son los centros de la más abundante síntesis de auxina en las plantas. Otras fuentes ricas son los tejidos meristemáticos, como aquellos de las hojas jóvenes en desarrollo, flores, frutos y semillas (107, 108).

Las enzimas para la conversión del triptofano en el AIA están presentes generalmente a través de la planta y son especialmente activas en regiones de intensa actividad metabólica, tales como meristemas, hojas en expansión, frutos y puntas de raíz (107).

De manera particular, en maíz se ha identificado el AIA en varios segmentos de la raíz, a través de la cromatografía líquida de gas (114). El contenido en la cápsula de la raíz (0.0-0.5 mm) fue de 356.6  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco, en el meristemo (0.5-1.0 mm) de 179.9  $\mu\text{g/g}$ , y en la región de alargamiento celular (1.0-4.0 mm) de 76.5  $\mu\text{g/g}$ . Además de la cápsula, otra

zona con alto contenido de AIA es el estele de la raíz (115). Esta auxina se ha determinado, también, en la punta del coleóptilo (116), en el mesocótilo de plántulas etioladas (117), y una acumulación de la misma durante las últimas etapas del desarrollo del grano (118).

#### 4.3 Transporte de auxinas

La influencia de las auxinas en el crecimiento y desarrollo de las plantas son, en general, reflejos del patrón polar de su distribución. Entre los procesos que se han visto influidos por este fenómeno se encuentran, entre otros, la dominancia apical y los tropismos (109).

El movimiento de la auxina endógena en tallos es predominantemente en dirección basipétala, esto es, hacia la raíz. Hay evidencias de que en las plantas intactas la auxina endógena se mueve rápidamente en el floema (107). Muchos trabajos muestran que el transporte de auxinas en las raíces también es polar, siendo la dirección predominantemente acropétala, es decir, de la base del tallo hacia la punta de la raíz (109, 111).

La polaridad del movimiento se ha demostrado, además, para varias auxinas sintéticas como el 2,4-D y el ácido naftalenacético (107).

#### 4.4 Efectos de las auxinas

La aplicación exógena de fitorreguladores a los tejidos es uno de los métodos más comunes en la investigación para estudiar el modo de acción de dichas sustancias, ya que de esta manera es posible controlar su nivel y medir el efecto producido (119).

Esta aplicación exógena de las sustancias reguladoras frecuentemente ocasiona cambios notables en el crecimiento y desarrollo. Tales cambios involucran división, alargamiento y diferenciación celulares. Ya que, por un lado, la división celular involucra a la síntesis del ADN y, por otro lado, el alargamiento y la diferenciación celulares implican cambios en el complemento proteico de las células, se ha considerado que los fitoreguladores actúen por regulación de la duplicación del ADN y su transcripción a ARNm (120).

#### • Efectos de las auxinas en los ácidos nucleicos

Hay una gran cantidad de reportes en la literatura sobre los cambios inducidos en los ácidos nucleicos por acción de auxinas; sin embargo, no se ha podido establecer una hipótesis única con respecto al control hormonal de la duplicación, transcripción o traducción. A la fecha, no se sabe con exactitud si los efectos fisiológicos inducidos o controlados por auxinas se llevan a cabo mediante un sólo sitio de acción primario, con una posterior amplificación específica de la señal en cada tejido, o si dichos efectos se producen a través de varios mecanismos paralelos, también específicos para cada tejido (121). Algunos de los resultados obtenidos en esta área se presentan a continuación.

Uno de los primeros trabajos fue el de Silberger y Skoog (122), quienes reportaron un marcado efecto del AIA en el contenido de ARN y ADN en rebanadas de médula de tallo de tabaco. En bajas concentraciones el AIA incrementó la división celular y el contenido del ADN; sin embargo, en concentraciones mayores hubo un incremento en el contenido del ADN pero no se presentó la división celular.

Se ha examinado la relación entre auxinas, ácidos nucleicos y alargamiento celular en diferentes sistemas. Uno de ellos es el de epicótilos de lenteja donde hubo una correlación entre

elongación celular inducida por auxinas y la síntesis del ADN pero, en coleóptilos de maíz y secciones de tubérculos de alcachofa no se encontró dicha correlación, ya que el crecimiento inducido por la auxina no resultó afectado en presencia de un inhibidor de la síntesis del ADN (120). Debido a la diferencia de resultados, incluidos éstos, no se ha determinado con exactitud el papel que puede jugar la síntesis del ADN en el control del alargamiento celular por auxinas.

Varios investigadores han reportado un incremento en la síntesis tanto de proteínas como de ARN en tejidos tratados con auxinas (120, 123). Estos resultados sugieren que la acción primaria de las auxinas puede ser a nivel de transcripción (124). Estas substancias podrían formar un complejo con un receptor específico, de manera que dicho complejo alterase la transcripción. Esta hipótesis basada en la presencia de un receptor específico se apoya en el mecanismo de acción de ciertas hormonas animales que actúan mediante la participación de receptores proteicos (125). Este modelo permite explicar la estereoespecificidad que aparentemente se requiere para obtener la respuesta a la aplicación de diferentes auxinas (111).

Al respecto, se ha estudiado ampliamente la existencia de proteínas con alta afinidad para auxinas en diferentes tejidos de vegetales (126, 127, 128), y se han localizado posibles receptores a nivel de membrana (129, 130) o citoplasma celular (131).

Las evidencias en relación a la funcionalidad de un receptor para auxinas son escasas. No obstante, se ha purificado en células de tabaco en cultivo una proteína identificada como receptor. En un sistema *in vitro*, la adición de auxina provoca un estímulo en la transcripción, medida ésta como incorporación de uridina tritiada al ARN en núcleos de tabaco funcionales, sólo si se agrega en presencia de la proteína receptora (132).

Por otro lado, en diferentes tejidos vegetales se han obtenido evidencias de que las auxinas pueden influir en la actividad de las polimerasas y en la disponibilidad del molde (133, 134). Tam-

bién hay evidencias de que las auxinas producen un incremento en los niveles del ARNm (135, 136, 137), el cual está asociado con la producción de polisomas (135).

Se han detectado cambios específicos en las proteínas sintetizadas en diferentes tejidos de vegetales después de un tratamiento con auxinas (16, 138, 139, 140). Las modificaciones de estos patrones implican cambios muy significativos, como la presencia de proteínas nuevas, proteínas que dejan de sintetizarse y otras que modulan la velocidad de su síntesis. Esto se ha denominado patrón de proteínas auxino-modulables, cuya relación, al menos en parte, está a nivel de transcripción (16, 141, 142). Sin embargo, no se ha podido identificar la función de estas proteínas, pero se ha logrado una aproximación al identificar, entre el grupo de proteínas auxino-regulables, a las proteínas ribosomales (143). Recientemente se ha encontrado que las auxinas estimulan la fosforilación de diversas proteínas (16), entre las que se han identificado a su propio receptor proteico (144), algunas proteínas ribosomales (145) y otras nucleares (146).

Por otro lado, para tratar de identificar ese tipo de proteínas, se han aislado los ARNm a partir de hipocótilos de soya y epicótilos de chícharo tratados con AIA. Estos mensajeros se han traducido en sistemas *in vitro* y se ha encontrado que varios de sus productos se originan por el efecto de auxinas (142); en la actualidad se ha intentado su clonación (121, 139). En algunos casos se han determinado sus secuencias y se ha encontrado que codifican para proteínas hidrofílicas (147).

#### • Auxinas y división celular

##### Explantos de tejidos:

Los cultivos vegetales se originan a partir de diferentes tejidos u órganos, a través de la formación de un callo en crecimiento. Para sostener dicho crecimiento se requiere de un medio adicionado de nutrientes y reguladores del crecimiento como

son auxinas y citocininas, cuya proporción varía ampliamente entre las diversas especies. Aunque se han descrito las características generales de la iniciación del cultivo, solamente en unos cuantos casos, y no recientemente, se han detallado algunos estudios sobre ciclo celular.

En los experimentos clásicos se emplean explantes de diferentes partes de las plantas; los cuales, generalmente, provienen de tejidos en reposo (quiescentes). El sistema más simple es el explante de alcachofa, que consiste casi enteramente de núcleos detenidos en  $G_1$  con un contenido 2C de ADN (148). La adición de auxinas al cultivo ocasiona una progresión sincronizada de una fracción de las células a través de S,  $G_2$  y M. También se ha demostrado que un suplemento de ácido abscísico (ABA) incrementa la proporción de núcleos que entran a S, en este sistema (149). Aunque la respuesta precisa de los explantes depende de la condición del tubérculo (150), este tejido proporciona evidencias para la acción de auxinas en el punto de control en  $G_1$  del ciclo celular.

Se ha encontrado una estimulación de la división celular de núcleos tanto diploides como tetraploides a partir de raíces de chícharo colocadas en un medio adicionado de auxina y citocinina (151). Un medio con auxina sola y timidina tritiada demostró que las diploides iniciales resultan de células detenidas en  $G_1$  y  $G_2$ . Las células tetraploides sólo se estimularon a dividirse por la adición de citocinina; pero, en este caso, la mayoría de las mitosis tetraploides iniciales presentaron diplocromosomas y no se marcaron radiactivamente. Después de un largo periodo de cultivo en presencia de citocinina, se observaron mitosis tetraploides sin diplocromosomas marcados radiactivamente, sugiriendo que la exposición prolongada a la citocinina sostuvo la continuidad en la síntesis del ADN en las células tetraploides. La complejidad de la respuesta en esos explantes de chícharo está relacionada en parte con la respuesta de las células en diferentes tejidos dentro de la raíz (por ejemplo las células tetraploides están confinadas a la corteza), pero proveen poca evidencia acerca de efectos exclusivos en los puntos de control

$G_1$  y  $G_2$  por auxinas y citocininas respectivamente.

#### Protoplastos:

Aunque los protoplastos presentan un número de ventajas potenciales sobre los explantes, para efectuar estudios sobre la iniciación del ciclo celular en cultivo (152), los estudios en el área son muy pocos.

El cultivo de protoplastos de tabaco en presencia de auxina y citocinina, aparentemente conduce a las células a una progresión semi-sincrónica a través de S,  $G_2$  y M. Podría parecer que se requieren ambos fitorreguladores para la iniciación de la síntesis del ADN y la mitosis, aunque el requerimiento de citocinina para la iniciación de la fase S sólo se hace aparente después de un periodo de cultivo en presencia de la auxina sola (153).

#### Cultivos establecidos:

En general, todos los cultivos celulares de vegetales necesitan un suministro exógeno de auxina para un continuo crecimiento indiferenciado. La omisión de auxina conduce a un rápido cese del crecimiento y la división celular (154, 155, 156). En los casos donde no se requiere de dicho suministro, se han implicado niveles elevados de producción endógena de auxina (157, 158).

En cultivos de tabaco creciendo en un medio adicionado con ácido naftalenacético (ANA) y timidina tritiada, se han observado, primero, mitosis iniciales no marcadas, y después, mitosis marcadas. Esto ha sugerido que esas células estuvieron detenidas en las fases de  $G_2$  y  $G_1$  respectivamente, al tiempo de la falta de ANA. El autor ha señalado que las células bloqueadas en dichas etapas pueden conducir a un cultivo semi-sincrónico al suministrarse la auxina (154).

Aparentemente se ha logrado la sincronización de un cultivo en suspensión de células de zanahoria, por remoción y re-sumi



nistro de 2,4-D. La privación de esta auxina ocasiona una detención en G<sub>1</sub> con base en que un pico de actividad mitótica ocurre sólo después de un periodo de síntesis del ADN en cultivos estimulados a crecer por un re-suministro de 2,4-D (159).

## B ANTECEDENTES PARTICULARES

Como se mencionó anteriormente, las auxinas están implicadas en procesos de elongación, división y diferenciación celulares (120, 156).

En nuestro laboratorio se han realizado experimentos tendientes a ampliar el conocimiento sobre la acción de auxinas a diferentes niveles durante la germinación de maíz. Para lo cual se ha probado el efecto -además de la auxina natural AIA- de una auxina sintética, el ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico o MCPP, un análogo del 2,4-D.

Los tejidos de maíz han demostrado ser sensibles a la acción del MCPP. Esta auxina es más eficiente en la inducción y crecimiento de callos de maíz que el 2,4-D, el fitorregulador más ampliamente usado en el cultivo *in vitro* en maíz (14).

La aplicación exógena del MCPP a embriones de maíz en germinación, altera el proceso normal para dar lugar a la formación de callo, en vez de desarrollarse una plántula normal (15); esta inducción se vuelve irreversible en el periodo de 18 a 24 h, es decir, durante el periodo final de la germinación (160).

En relación a la síntesis de proteínas, que es uno de los primeros procesos que se observa durante la germinación (161), se ha demostrado que, en maíz, el MCPP altera cuantitativa y cualitativamente las proteínas sintetizadas durante el periodo de 18 a 24 h de imbibición, además de que se incrementa la

fosforilación de proteínas sintetizadas durante su germinación (16, 145). Muy probablemente se encuentren las histonas dentro de las proteínas sintetizadas en este periodo, como lo sugieren Aguilar y Sánchez de Jiménez (26), y algunas proteínas ribosomales, como se ha demostrado recientemente (145). Al respecto, particularmente en el caso de células animales, se ha correlacionado la fosforilación de proteínas histónicas específicas con la regulación del ciclo celular (69, 85).

Los estudios referentes al efecto de auxinas a nivel de división celular son escasos. Sin embargo, se ha señalado que dichas auxinas ejercen control en el ciclo celular, aún cuando no se sabe si es a través de cambios en el metabolismo de ácidos nucleicos o proteínas o si, a través de un efecto más sutil, dispara uno o varios pasos de la división celular (17).

Con base en la información señalada hasta ahora se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

## SECCION II ESTUDIO

### I. HIPOTESIS

Durante la maduración del grano de maíz, las células de los tejidos meristemáticos detuvieron su ciclo celular en alguna o varias etapas específicas del mismo, de manera que durante la germinación reanudarán el proceso a partir de esa (s) fase (s). Este ciclo celular puede ser modulado por la acción de las auxinas afectando alguna o algunas de dichas etapas de manera específica.

Para probar esta hipótesis se requiere contestar varias preguntas como son ¿en qué momento las células meristemáticas se dividen durante la germinación? Es decir, ¿la germinación de maíz (protrusión de la radícula) involucra la división celular y la síntesis del ADN? ¿Qué células reinician primero el proceso de división celular? Las primeras células que se dividen después de salir de un estado quiescente ¿lo hacen sincronizadamente? ¿Cómo afectan las auxinas el desarrollo de la división celular, durante el periodo de germinación? ¿Cómo actúan las auxinas a nivel del ciclo celular?

Para comprobar esta hipótesis se ha propuesto el siguiente objetivo general.

## 2. OBJETIVO

a) Caracterizar el ciclo celular de las células meristemáticas de maíz durante la germinación, determinando cómo, cuándo y dónde se inicia la división celular en estas células.

b) Estudiar el efecto de auxinas exógenas, en el ciclo celular, conociendo que son moduladoras de dicho proceso.

## 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El material biológico empleado lo integran semillas de maíz H-30 de cosecha reciente de Chapingo, Edo. de México.

Se utilizaron dos sistemas para el estudio: a) ejes embrionarios crecidos en medio de cultivo, y b) semillas germinadas. Esto debido a que son los sistemas implicados directamente en el proceso de germinación. Se estudió el efecto de la auxina sintética MCPP sobre dichos sistemas, debido a que el maíz ha demostrado ser sensible a ella (14, 15, 16). Para el estudio de la cinética de la división celular se hicieron cortes de los ejes embrionarios para aislar los tejidos meristemáticos del mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria. Esto durante diferentes periodos de germinación.

Se empleó timidina marcada radiactivamente para seguir, por autorradiografía, la incorporación de esta base al ADN durante la fase S, y se determinaron los índices mitóticos como indicadores del proceso de división celular.

En todos los parámetros se analizó el efecto de la auxina MCPP exponiendo los tejidos a la acción de la misma.

## SECCION III MATERIALES Y METODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas maduras de maíz (*Zea mays* L.) del híbrido H-30 de cosecha reciente (1985-1987), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Chapingo, Edo de México.

Los ejes embrionarios se obtuvieron a partir de las semillas mediante disección manual.

### 2. EQUIPO

Campana de flujo laminar, VECO  
Placas de calentamiento y agitación, CORNING  
Potenciómetro, SARGENT WELCH Modelo PBL  
Autoclave, ELECTRIC STEREOCLAVE 25 X  
Incubadora, GRIFFIN  
Balanza analítica, METTLER  
Microscopio de disección, OLYMPUS  
Microscopio óptico, ZEISS  
Contador de células, CLAY ADAMS  
Baño de agua de temperatura constante, J.M. ORTIZ

### 3. REACTIVOS

Los reactivos utilizados pertenecen a Backer, Merck, Qui-morgan, Sigma, Pharmacia, Kodak y Amersham.

### 4. CURVAS DE GERMINACION

Debido a que las auxinas promueven el crecimiento en plantas, se consideró necesario primero determinar el efecto de estas sustancias sobre la germinación, para lo cual se esterilizaron superficialmente lotes de 50 semillas de maíz que fueron sumergidas en etanol al 70 % durante 3 min y se enjuagaron 2 veces con agua desionizada estéril. Posteriormente se colocaron en algodón humedecido en cajas de Petri a  $25 \pm 1^{\circ}$  C y oscuridad constantes. La protrusión de la radícula se empleó como criterio de germinación.

Los lotes control se mantuvieron en contacto sólo con agua desionizada, mientras que otros se trataron con la auxina MCPP en concentraciones de 1 y 5 mg/l. Estas concentraciones se aplicaron con base en resultados obtenidos anteriormente (15). En cada lote se cuantificó el número de semillas en las cuales la radícula había protruído, a partir de las 18 h, y a cada 3 h, hasta las 48 h de incubación. Se realizaron 4 repeticiones de cada experimento.

### 5. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Para estudiar la cinética de la división celular en embriones de maíz durante la germinación, así como el efecto de la auxina MCPP sobre este proceso, se emplearon tanto ejes embrionarios aislados manualmente como semillas intactas, los cuales se mane-jaron de la siguiente forma.

### 5.1 Desinfección de los ejes embrionarios

Diversos lotes de 25 ejes embrionarios de maíz, previamente disectados, se colocaron en cajas de Petri y se cubrieron con etanol al 70 % por 20 seg. Se enjuagaron con agua desionizada estéril e inmediatamente se suspendieron en hipoclorito de calcio al 5 % durante 10 min. Después se enjuagaron 2 veces más con agua desionizada estéril e incubaron en los medios de cultivo correspondientes.

Estos pasos se efectuaron bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar.

### 5.2 Desinfección de las semillas

Diferentes lotes de 30 semillas se sumergieron en etanol al 70 % durante 1 min y después se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril. Posteriormente, se sembraron las semillas entre dos capas de algodón humedecido.

## 6. MEDIO DE CULTIVO

Para lograr el desarrollo de los ejes embrionarios disectados manualmente, se empleó el medio de cultivo sólido basal de Murashige y Skoog (MS) (162), el cual contiene piridoxal 0.0024 mM, tiamina 0.003 mM, mio-inositol 0.55 mM, glicina 0.026 mM, ácido nicotínico 0.004 mM, sacarosa 87.6 mM y agar (Difco) 7.5 g/l de medio y a pH de 5.8. Para determinar el efecto de la auxina sintética MCPP (ácido 2(2-metil, 4 cloro fenoxi-propiónico)), este medio se adicionó con 5 mg/l. Dicha concentración se determinó considerando los datos de Sánchez de Jiménez y colaboradores (15).



Es necesario hacer notar que, durante la preparación de este medio, la auxina requiere de unas gotas de KOH para disolverse. Una vez disuelta se agrega al final del proceso, junto con la sacarosa, y antes de ajustar el pH a 5.8 con una solución de HCl 0.1 N. Por otro lado, es necesario lavar el agar con agua desionizada mediante un filtro de placa porosa, hasta que el agua del lavado sea incolora. Una vez limpio se agrega al medio y se funde.

Se colocaron 5 ml de medio por tubo de cultivo. Todos estos tubos se taparon con papel aluminio y esterilizaron por 15 min a  $1 \text{ K/cm}^2$  de presión y  $124^\circ \text{ C}$ .

#### 6.1 Sistemas de incubación

##### *In vitro:*

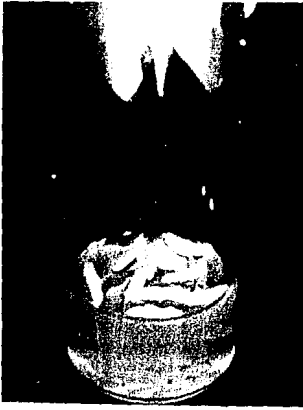
Los ejes embrionarios aislados se incubaron bajo condiciones estériles, en un medio sólido con o sin MCPP, y se colocaron de 7 a 8 ejes por tubo (Fig 4 A).

##### *In vivo:*

Las semillas maduras se germinaron en algodón humedecido con agua desionizada o con 5 mg/l de MCPP, y se aplicaron cantidades iguales en cada lote (Fig 4 B).

Ambos sistemas se mantuvieron en crecimiento a  $25 \pm 1^\circ \text{ C}$  y obscuridad constantes, por diferentes periodos indicados en cada experimento.

Para el caso de las semillas, al término de cada periodo los ejes embrionarios se disectaron manualmente durante la germinación para fijarse de inmediato.



A

Sistema *in vitro*



B

Sistema *in vivo*

FIG. 4. SISTEMAS DE INCUBACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

## 7. VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

Los ejes embrionarios empleados provinieron de semillas con un 86 a 90 % de germinación a las 48 h.

## 8. DISECCION DE MERISTEMOS Y ELABORACION DE PREPARACIONES

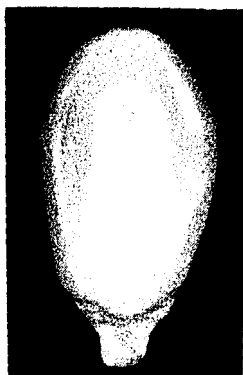
### 8.1 Disección de meristemos

Al término de cada tiempo de incubación, los ejes embrionarios se fijaron por 12 h en alcohol etílico al 70 %, en donde se mantuvieron a 4<sup>o</sup> C hasta su disección (máximo 24 h después).

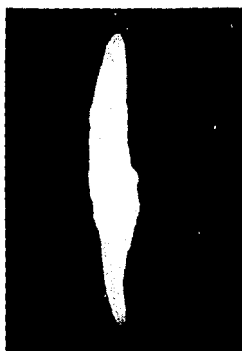
De los 25 ejes existentes en cada punto experimental, se tomaron 15 de ellos con base en su tamaño promedio y se diseccionaron bajo el microscopio de disección las regiones meristemáticas presentes en el mesocótilo (meristemo apical) y en los primordios de las raíces seminales y de la raíz primaria (meristemos radiculares) (Fig 5). Las muestras se colectaron a partir de las 6 h, y a cada 4 h, hasta las 48 h de incubación o germinación.

### 8.2 Elaboración de preparaciones

Una vez diseccionados los tejidos se hidrolizan con HCl 1 N a 60<sup>o</sup> C por 8 min y después se colocaron en pectinasa (Quimorgan, S.A.) al 5 % por 50 min (163). A continuación, la tinción se realizó con orceína acética (Merck) durante 45 min (164). Posteriormente, cada tejido se colocó en un portaobjetos limpio y se agregaron unas gotas de ácido acético al 45 %, para



SEMILLA



EJE EMBRIONARIO

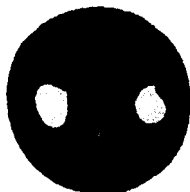
a

b

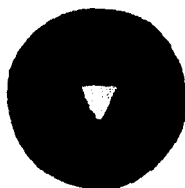
c



a mesocótilo



b raíces  
seminales



c raíz primaria

FIG. 5. MATERIAL BIOLÓGICO

hacer un extendido de células mediante la presión con la punta de un lápiz.

Las preparaciones se hicieron permanentes mediante la técnica de Conger y Fairchild (165), para lo cual se deshidrataron con etanol absoluto y se montaron con bálsamo de Canadá.

Para la elaboración del colorante se pesó 1 g de orceína sintética (Merck) y se disolvió en 100 ml de ácido acético (Merck) al 45 % hirviendo en un matraz y en agitación constante. Se dejó hervir tapado durante 10 min también con agitación constante, después se dejó enfriar y finalmente se filtró (166).

## 9. DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO

Para cada uno de los tejidos, y en cada tiempo de incubación o germinación, se localizaron y observaron las figuras mitóticas bajo el microscopio óptico (40 X); se cuantificó un total de 10,000 células para cada punto experimental. El índice mitótico (IM) se determinó en campos al azar de células meristemáticas y se aplicó la siguiente ecuación (167):

$$IM = \frac{\text{número de células en mitosis}}{\text{número total de células observadas}} \times 100$$

De cada experimento se hicieron dos repeticiones al menos y siete como máximo.

## 10. DETERMINACION DEL INDICE DE FASES

Para la valoración de este parámetro se procedió en forma similar a la indicada para la determinación del índice mitótico,

y se cuantificó el número de células en cada una de las etapas de la mitosis: profase, metafase, anafase y telofase, en lugar del número de células en mitosis.

De cada experimento se hicieron dos repeticiones al menos y siete como máximo.

## 11. AUTORRADIOGRAFIA

Para estudiar el reinicio de la mitosis, a partir de puntos específicos del ciclo celular, y el periodo de inicio de la síntesis del ADN, en células meristemáticas de maíz durante la germinación, se realizaron estudios autorradiográficos de células tanto en mitosis como en interfase.

Se incubaron lotes de 25 ejes embrionarios aislados manualmente en tubos conteniendo medio de cultivo. A cada tubo con 5 ml de medio MS y con 12 a 15 ejes, se le adicionó 50  $\mu$ l de una solución de 50  $\mu$ Ci/ml de timidina tritiada (actividad específica 87 Ci/m mol, Amersham). De acuerdo con el experimento, este medio de cultivo estuvo o no adicionado con 5 mg/l de la auxina MCPP, la cual se mantuvo en forma continua; es decir, desde el inicio de la incubación hasta el momento de la colecta del material biológico. Los controles correspondientes se mantuvieron en medios basales carentes de la auxina.

La solución de timidina tritiada se aplicó en un pulso de 6 h, de las 14 a las 20 h de incubación. En seguida, los ejes embrionarios intactos se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril. Los lotes correspondientes se sembraron en un medio de incubación nuevo para la continuación de su crecimiento por diferentes periodos. Al término de éstos, se fijaron los ejes embrionarios en una solución de alcohol etílico : ácido acético (3:1).

Todo el experimento se realizó bajo condiciones de esterili-

dad y se mantuvo a  $25 \pm 1^{\circ}$  C y oscuridad constantes.

La timidina tritiada se disolvió en un buffer de imbibición conteniendo cloranfenicol  $10 \mu\text{g/ml}$ , cloruro de potasio  $50 \text{ mM}$ , cloruro de magnesio  $10 \text{ mM}$ , Tris-HCl  $50 \text{ mM}$  y sacarosa al  $2 \%$  (168).

Los lotes control se mantuvieron en forma similar a los lotes en presencia de timidina tritiada, excepto que se les aplicó "un pulso" de agua desionizada estéril ( $50 \mu\text{l}$  por tubo) en lugar de la marca radiactiva.

Al término de cada tiempo de incubación se colectaron los ejes embrionarios y se manejaron en una forma igual a la mencionada anteriormente (apartado 8), elaborando preparaciones de las regiones meristemáticas presentes en las zonas del mesocótilo, raíces seminales y raíz primaria.

Una vez teñidas las preparaciones, como se describió previamente, se separaron de sus cubreobjetos después de la congelación en hielo seco y se cubrieron con la emulsión fotográfica NTB 2 (Kodak) y se dejaron en exposición durante 28 días en la oscuridad y a  $4^{\circ}$  C (169, 170).

La emulsión fotográfica se diluyó con agua desionizada estéril (1:1) y se licuó a  $40^{\circ}$  C en un baño de agua; se evitó la formación de burbujas. Después de sumergir las preparaciones en la emulsión, se dejaron secar y se guardaron en cajas de preparaciones conteniendo muñecas de gel de sílice para retener la humedad. Se mantuvieron en completa oscuridad y perfectamente cerradas.

Para determinar la incorporación real de marca, se expusieron portaobjetos limpios a la emulsión y se determinó la cantidad basal de gránulos de plata precipitados de fondo ("background").

Las autorradiografías se revelaron con Kodak D-19 (3 min),

se lavaron con agua destilada (1 a 2 min), se fijaron con ácido rápido de Kodak (5 a 6 min) y se lavaron 3 veces más también con agua destilada (3 min).

Para las determinaciones del índice mitótico, índice mitótico marcado y núcleos interfásicos marcados, se revisaron 15 preparaciones para cada punto experimental y se cuantificaron en campos al azar 10,000 células en cada punto.

De cada experimento se hicieron dos repeticiones como mínimo.

## 12. ESTADISTICA

Los datos obtenidos se expresaron, en general, como promedios más-menos la desviación estándar. Para los análisis de significancia estadística se emplearon la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para proporciones y la prueba de "t de student" (t).

La prueba de chi cuadrada para proporciones se utilizó para comparar el porcentaje de germinación a través del tiempo, (en presencia y ausencia de la auxina MCPP), la proporción de fases de la mitosis con respecto al tiempo de incubación, y el porcentaje del índice mitótico con y sin incorporación de timidina tritiada a través del tiempo (en presencia y ausencia del MCPP).

La prueba de "t de student" se empleó para comparar la frecuencia de divisiones celulares con respecto al tiempo (en presencia y ausencia del MCPP) (171, 172).

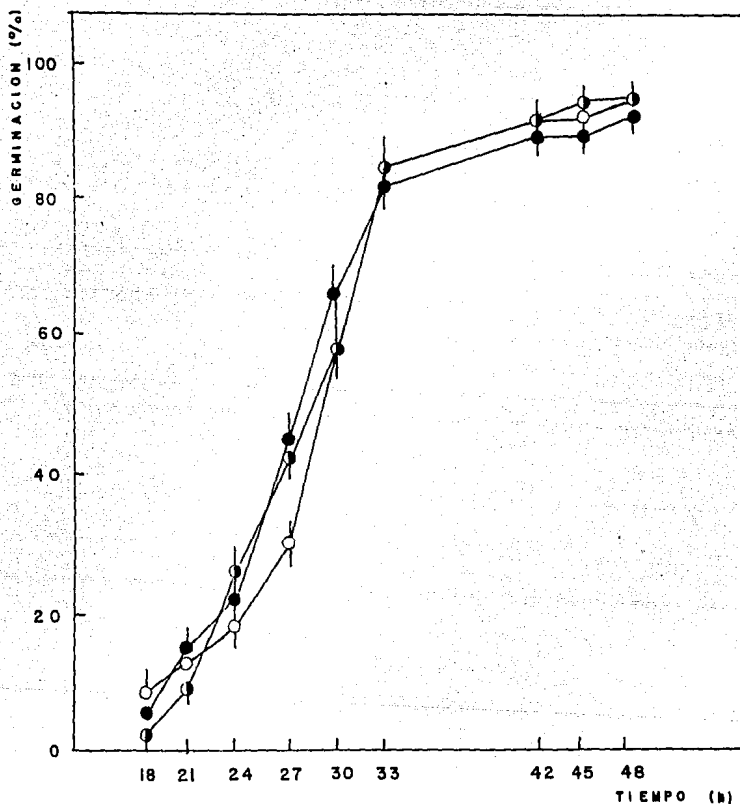


## SECCION IV RESULTADOS

### 1. ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP EN LA GERMINACION DE MAIZ

#### 1.1 Curvas de germinación

Al investigar el efecto de la auxina MCPP sobre la tasa de germinación, se encuentra que alrededor del 93 al 95 % de las semillas ha germinado aproximadamente entre las 42 y las 45 h de incubación. Los resultados obtenidos (Gráfica 1) muestran que el MCPP aplicado en concentraciones de 1 y 5 mg/l, en exposición continua (de 0 a 48 h), no tiene un efecto significativo sobre la tasa de germinación. Con el tiempo, se observa que el incremento en el porcentaje de germinación en los lotes tratados es muy similar al observado en el lote testigo; sin embargo, hay una diferencia entre ambos lotes alrededor de las 27 h de incubación. Esta diferencia resulta ser significativa estadísticamente tanto en el lote tratado con 1 mg/l como en el incubado con 5 mg/l. El experimento señala que aparentemente hay un mayor número de semillas germinadas en presencia del MCPP entre las 24 y 30 h de germinación.



○ CONTROL      ● MCPP (1mg/l)      ⊙ MCPP (5mg/l)

EFFECTO DEL MCPP EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE MAIZ. Se emplearon lotes de 50 semillas por experimento y se efectuaron 4 repeticiones. Como criterio de germinación se consideró la protrusión de la radícula.

27 h de germinación	1 ppm	$\chi^2=4.8$	gl=1	p<0.05
	5 ppm	$\chi^2=3.8$	gl=1	p=0.05

## 2. CINETICA DE LA DIVISION CELULAR EN MERISTEMOS PRIMARIOS DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION

### 2.1 Indice mitótico

Se determinó la cinética de las primeras divisiones celulares a través de la medición del índice mitótico en los meristemos primarios localizados en las zonas del mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria, presentes en el tejido embrionario de maíz (Fig 5). El proceso se estudió tanto en ejes embrionarios disectados manualmente e incubados en medio MS basal (sistema *in vitro*) (Gráfica 2) como en ejes embrionarios provenientes de semillas germinadas por el mismo periodo (sistema *in vivo*) (Gráfica 3).

En ambos sistemas de incubación se observa un patrón de división celular muy similar entre cada uno de los tejidos comparativamente analizados. El primer tejido en iniciar la división es el mesocótilo (18 a 20 h), más tarde lo hacen las raíces seminales (24 a 28 h) y finalmente la raíz primaria (28 a 32 h). Una vez que se inicia la proliferación celular, ésta se incrementa en los tres tipos de tejidos a través del tiempo y alcanza una máxima frecuencia prácticamente en forma simultánea para cada sistema (Gráficas 2 y 3).

Se reconocen para cada meristemo ondas (poblaciones) de células que entran a la mitosis a tiempos específicos, habiendo una diferencia en el tiempo de entrada a la división entre cada uno de los tejidos.

Se obtiene un índice mitótico máximo en los tres meristemas a un tiempo en particular. En el sistema *in vivo* se observa dicho índice a las 34 h de incubación (Gráfica 3) y en el *in vitro* a las 36 h, pero, en este caso, la raíz primaria es una excepción, ya que en ésta el valor máximo se presenta alrededor de las 32 h de incubación y en porcentajes muy bajos

(Gráfica 2).

Para los tres tejidos se observa una disminución en el índice mitótico entre las 36 y 40 h de imbibición, independientemente del sistema de incubación; después se presenta un nuevo incremento para todos los casos hacia las 44 y 48 h de incubación. Este aumento resulta ser muy pronunciado en el caso del sistema *in vivo* (Gráficas 2 y 3).

El tiempo de entrada a la división celular es muy cercano para cada tejido, al comparar los dos sistemas de crecimiento, no obstante que en *in vitro* esta división se inicia alrededor de 2 a 4 h antes que en *in vivo* para el caso del mesocótilo y las raíces seminales, respectivamente.

También se observa que estos meristemos, dependiendo del sistema presentan su máxima proliferación al mismo tiempo (36 y 34 h respectivamente), a pesar de haber iniciado su división celular a diferentes tiempos. La raíz primaria *in vivo* se comporta de igual forma.

Debe notarse que la raíz primaria *in vitro* tiene un comportamiento diferente con respecto a los otros dos meristemos en el mismo sistema y con respecto a ella misma pero *in vivo*. En el primer caso, su índice mitótico máximo se presenta a las 32 h y no a las 36 h como en los otros dos tejidos. En el segundo, hay un mayor número de células que se dividen *in vivo* durante el periodo de 28 a 48 h de incubación, habiendo una diferencia significativa en este caso ( $t < 0.01$ ).

El mesocótilo en el sistema *in vitro* tiene un comportamiento particular, ya que aproximadamente a las 28 y 36 h de imbibición se evidencian dos picos de valores máximos de índice mitótico (8.09 y 11.33 % respectivamente), lo que sugiere la presencia de dos poblaciones de células entrando a mitosis.

Para el resto de los tejidos, de manera general, los patrones de las curvas mostrados en las Gráficas 2 y 3 resultan ser simi-

lares al comparar cada tejido con respecto al sistema de incubación, lo que podría señalar la presencia en cada tejido de una población celular única que entra a mitosis a un tiempo específico; cada población aparentemente está sincronizada de forma natural.

Al comparar el comportamiento de las ondas de células que entran a la división en cada uno de los meristemos, analizados bajo los dos sistemas de incubación, se aprecia que tanto en la entrada de los tres tejidos a la mitosis, como la amplitud y duración de las ondas así como el porcentaje máximo del índice mitótico (excepto para la raíz primaria), es semejante en ambos sistemas, lo que apoya el empleo de uno u otro sistema para estudios sobre proliferación celular, con la consideración de que cada uno de ellos tiene sus diferencias.

## 2.2 Índice de fases

Por otro lado, se estudió el índice de fases de la mitosis durante los mismos periodos de incubación en los meristemos localizados en mesocótilo, raíces seminales y raíz primaria (Gráficas 4 y 5).

Al considerar la proporción en que contribuye cada fase al total de células en mitosis (tomando como 100 % el índice mitótico), en cada uno de los diferentes tejidos, se encuentra que las poblaciones celulares que reinician la división celular durante la imbibición, incluyen células en las diferentes etapas del proceso, es decir, profase, metafase, anafase y telofase, lo que indica que ciclan continuamente.

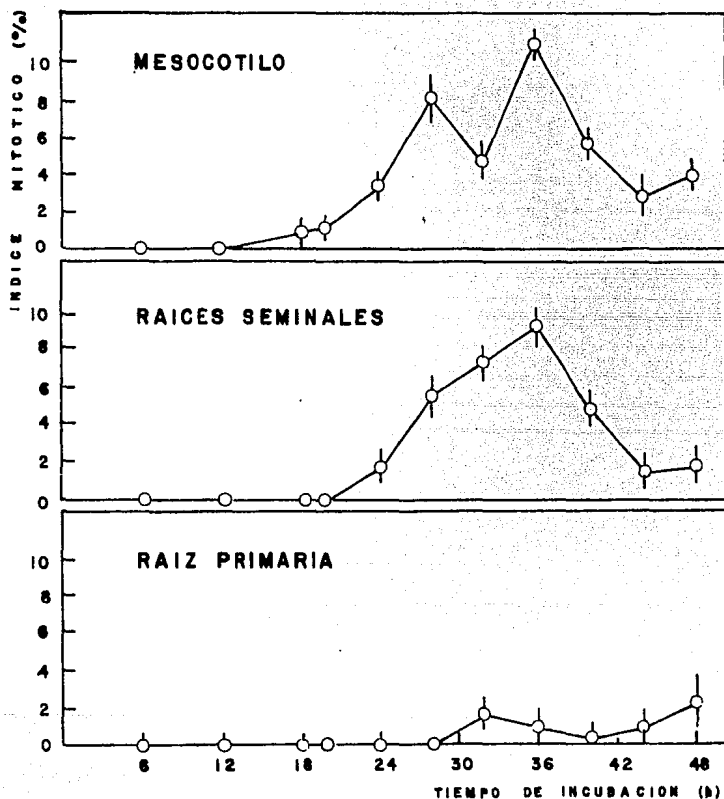
Es evidente que los resultados muestran una constancia en la mitosis independientemente del tejido y del sistema de incubación utilizado. La profase se encuentra siempre en una mayor proporción y abarca de un 50 a un 60 % en comparación con el resto de las fases, las cuales permanecen relativamente cons-

tantes a través del tiempo, y cuyos valores fluctúan entre 15 y 20 %.

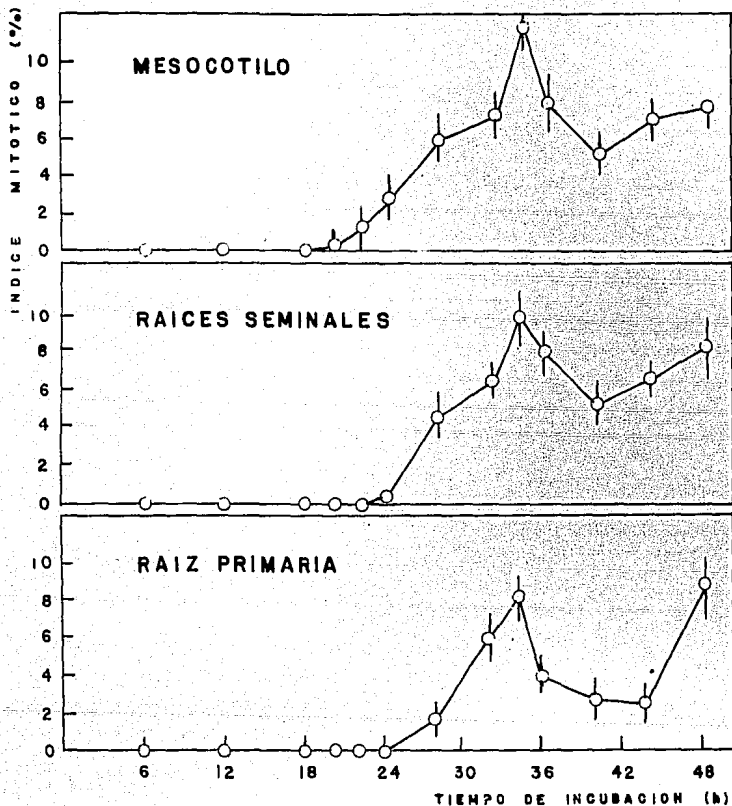
Una vez iniciada la división celular, la fracción de células existente en cada fase permanece constante a través del tiempo y es muy similar para cada tejido en ambos sistemas de crecimiento. Para el sistema *in vitro* hay una diferencia significativa con una  $p < 0.001$ , entre la profase y el resto de las fases, para cada uno de los tres meristemas. En el caso de la incubación *in vivo* esta diferencia también es significativa, con una  $p < 0.05$  para el mesocótilo y menor de 0.02 para las raíces seminales y la raíz primaria.

En los pies de figura en las Gráficas 4 y 5, sólo se ejemplifican algunos valores de  $X^2$ , aquellos en que aparentemente no habría una diferencia significativa.

GRAFICA 2



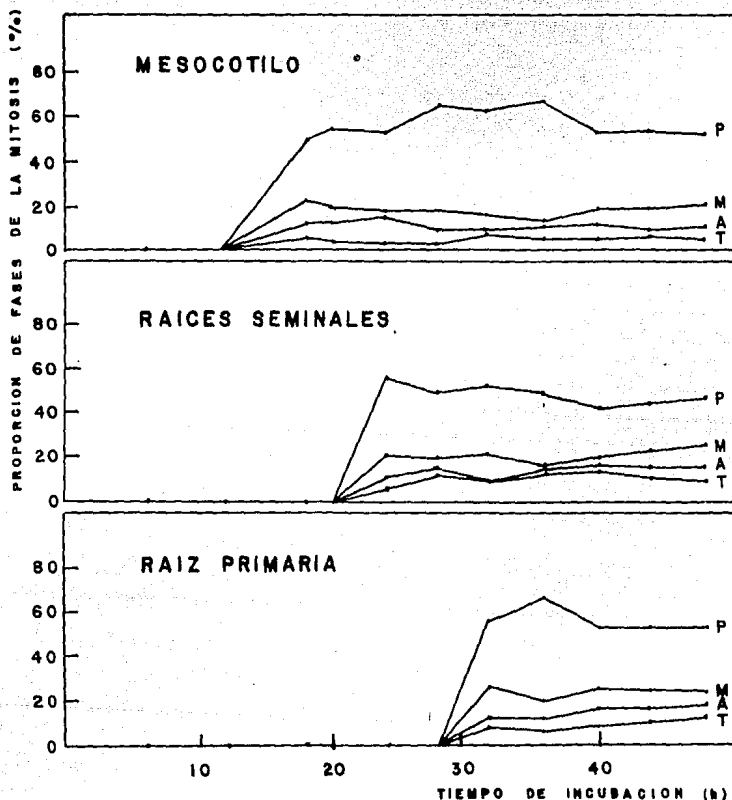
INDICE MITOTICO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DE MAIZ. (Sistema *in vitro*). Los ejes embrionarios se aislaron manualmente y se incubaron en un medio MS durante diferentes periodos. Las muestras se colectaron cada 4 h (IM/10,000 células).



INDICE MITOTICO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DE MAIZ. (Sistema *in vivo*). Los ejes embrionarios se obtuvieron a partir de semillas germinadas durante diversos periodos. Las muestras se colectaron cada 4 h (IM/10,000 células).



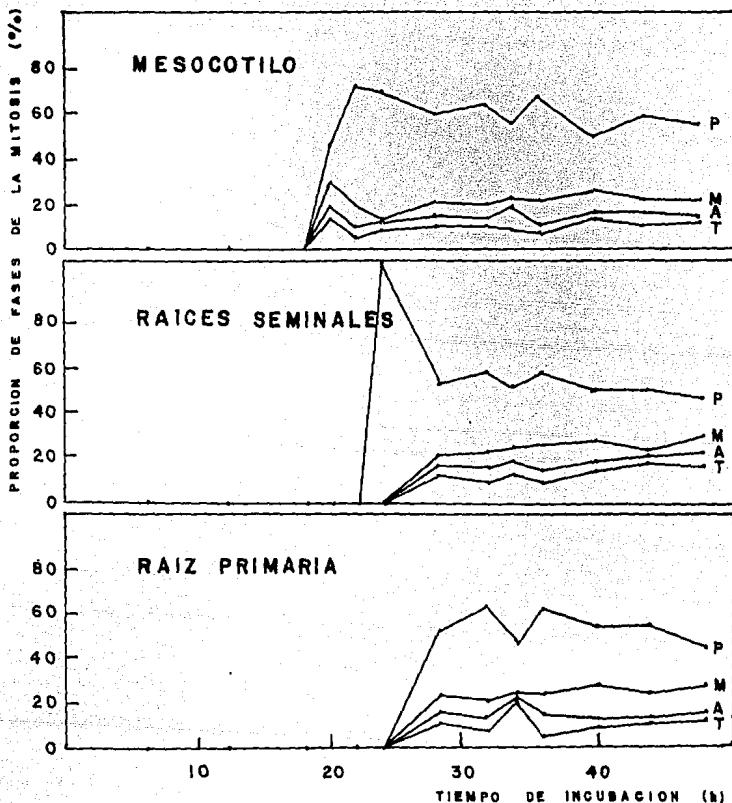
GRAFICA 4



**P** PROFASE    **M** METAFASE    **A** ANAFASE    **T** TELOFASE

PROPORCION DE LAS FASES DE LA MITOSIS. (Sistema *in vitro*).  
La prueba estadística muestra una diferencia significativa entre la profase y el resto de las fases para cada tejido.

	$\chi^2$	gl	p	
Mesocótilo (18 h):	11.05	1	>0.001	
Raíces seminales (40 h):	11.24	1	>0.001	
Raíz primaria (48 h):	10.96	1	>0.001	61



P PROFASE M METAFASE A ANAFASE T TELOFASE  
 PROPORCIÓN DE LAS FASES DE LA MITOSIS. (Sistema *in vivo*).  
 La prueba de  $X^2$  señala una diferencia significativa entre la profase y las otras fases para cada región.

	$X^2$	gl	p	
Mesocótilo (20 h):	4.35	1	<0.05	
Raíces seminales (40 h):	6.50	1	<0.02	
Raíz primaria (48 h):	6.33	1	<0.02	62

### 3. EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP SOBRE LA DIVISION CELULAR EN CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION

#### 3.1 Indice mitótico

Se estudiaron los meristemos localizados en el mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria de ejes embrionarios, los cuales se manipularon bajo los dos sistemas antes mencionados. Por un lado, se incubaron ejes embrionarios aislados manualmente (sistema *in vitro*) y por otro, semillas completas (sistema *in vivo*), y se les aplicó el MCPP en una concentración de 5 mg/l por un periodo de 0 a 48 h. Cabe mencionar que esta concentración del MCPP aplicada durante un lapso de 6 h, es suficiente para alterar los procesos bioquímicos normales del proceso de germinación, de manera que conduce a los tejidos a la formación de callos (15).

Los resultados obtenidos al emplear el sistema de incubación *in vitro* (Gráfica 6) muestran que la división celular se inicia en forma secuencial, presentándose primero en el mesocótilo (18 h) y finalmente en la raíz primaria (32 h). Conforme avanza el tiempo de incubación, se incrementa la proliferación celular en todos los casos, posteriormente disminuye y se vuelve a incrementar, aunque muy ligeramente en las raíces seminales, hacia el final del periodo de crecimiento (44 a 48 h). Es evidente que en el mesocótilo hay dos poblaciones que presentan su índice mitótico máximo a las 24 y 32 h de incubación. En las raíces seminales y la raíz primaria este valor máximo se observa a las 40 h y a las 32 h, respectivamente. De nuevo, la raíz primaria presenta el menor índice mitótico, en comparación con el mesocótilo y las raíces seminales.

El MCPP estimula la división celular en los tres meristemos pero en forma diferencial. Esta auxina muestra un mayor efecto sobre la región del mesocótilo, en cuyo caso los mayores incre-

mentos en el índice mitótico se presenta a las 24 h y de las 32 a las 40 h de incubación, los cuales resultan ser significativamente diferentes a las 24, 32 y 36 h ( $t=3.24, 4.00$  y  $3.91$ , respectivamente;  $p<0.05$  para 24 h y  $p<0.02$  para 32 y 36 h;  $gl=4$ ). En las raíces seminales la estimulación de la mitosis es evidente alrededor de las 40 h ( $t=2.56$ ;  $p>0.05$ ;  $gl=4$ ) y en la raíz primaria el MCPP prácticamente no tiene efecto.

Aproximadamente de las 44 a las 48 h de incubación en los tres tejidos meristemáticos hay una disminución de la mitosis en presencia del MCPP, la cual no resulta ser significativamente diferente al considerar una  $p>0.05$ ; los valores de  $t$  a las 48 h son 2.10, 0.76 y 1.75 para mesocótilo, raíces seminales y raíz primaria, respectivamente.

Los resultados encontrados en meristemas de ejes embrionarios provenientes de semillas completas germinadas por diferentes periodos (sistema *in vivo*) se presentan en la Gráfica 7. Nuevamente se aprecia una aparente programación, la cual se observa como una secuencia en el inicio de la división celular entre los tres meristemas: mesocótilo, raíces seminales y raíz primaria. También se presenta una población celular única en cada uno de estos tejidos, la cual muestra una tasa máxima de mitosis (6.3 %) alrededor de las 32 a las 36 h de incubación y un nuevo incremento entre las 44 y las 48 h.

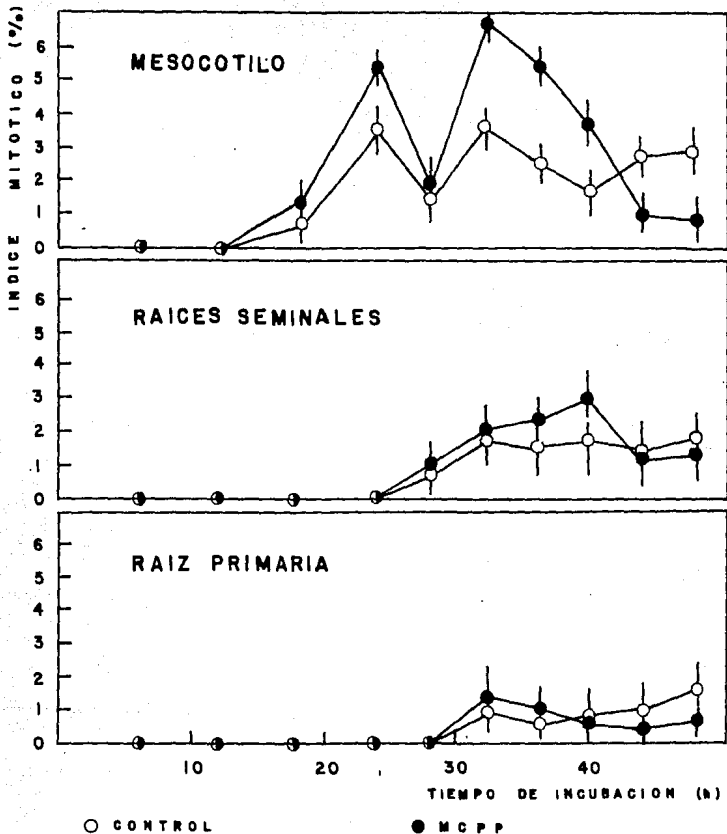
En presencia del MCPP hay un estímulo de la división celular en los tres diferentes tejidos. Este aumento es evidente sólo al inicio de la proliferación celular, en un periodo de 24 a 36 h; no obstante, este estímulo no es significativamente diferente considerando una  $p=0.05$ . Posteriormente el MCPP no tiene efecto (36 a 40 h) y hacia el final del periodo de incubación disminuye la frecuencia de las divisiones celulares (44 a 48 h). Esta inhibición de la mitosis sólo es significativamente diferente con respecto al control en las raíces seminales y en la raíz primaria, ambos a las 48 h de incubación ( $t=2.82$  y  $4.55$ , respectivamente;  $p<0.05$ ).

Al comparar las cinéticas del índice mitótico mostradas en las Gráficas 6 y 7 con las de las Gráficas 2 y 3, es evidente que hay una reproducibilidad del comportamiento de la división celular en los tejidos del mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria, consistente en la entrada de los tejidos a la mitosis en forma secuencial, el número de poblaciones que entran a la división por meristemo y la aparición de estas poblaciones por "ondas", así como la amplitud y duración de las mismas. A su vez, el MCPP (Gráficas 6 y 7) no modifica estos patrones de división celular, solamente estimula la mitosis, afectándola en forma diferencial, dependiendo del tejido y del tiempo de incubación. No obstante, el MCPP tiene un efecto sobre la mitosis, y ocurre una vez que el proceso se inicia; es decir, que no induce a que se presente la mitosis antes del tiempo programado en cada tejido.

Este efecto diferencial del MCPP sobre la mitosis se confirma al analizar, en el sistema *in vitro*, tres periodos de incubación: 24, 32 y 40 h (Tabla 1). En el mesocótilo la auxina incrementa la división celular en esos tres periodos, pero su efecto es significativo sólo a las 24 y 32 h. En las raíces seminales también estimula la mitosis, siendo mayor su efecto a las 40 h de incubación, el cual no es significativamente diferente con respecto al control. Finalmente, en la raíz primaria dicha substancia prácticamente no tiene efecto sobre la mitosis.

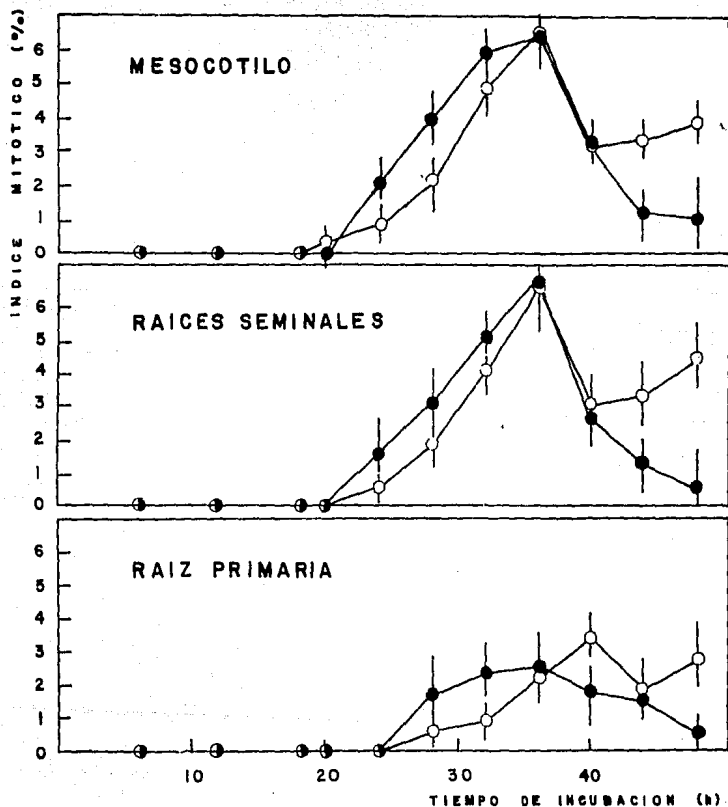
### 3.2 Índice de fases

Por otro lado, para saber cual de las fases de la mitosis está siendo afectada por acción del MCPP, se analizó su efecto en cada fase. Para ello, se tomaron como ejemplo algunos tiempos de incubación en los tres diferentes meristemos (Gráficas 8, 9 y 10). Al parecer, la auxina actúa preferencialmente sobre una de las fases de la mitosis en uno de los tejidos (mesocótilo) (Gráfica 8), ya que puede apreciarse un estímulo sobre la profase en los tres diferentes tiempos de incubación seña-



EFFECTO DEL MCPP SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR EN MERISTEMOS DE MAIZ. (Sistema *in vitro*). Ejes embrionarios aislados manualmente se incubaron en medio MS basal adicionado con 5 ppm de MCPP.

	t	gl	p
Mesocótilo (32 h):	4.00	4	< 0.05
Raíces seminales (40 h):	2.56	4	> 0.05
Raíz primaria (32 h):	0.52	4	> 0.05



○ CONTROL

● MCPP

EFFECTO DEL MCPP SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR EN MERISTEMOS DE MAIZ. (Sistema *in vivo*). Se pusieron a germinar las semillas en un sustrato adicionado con 5 ppm de MCPP.

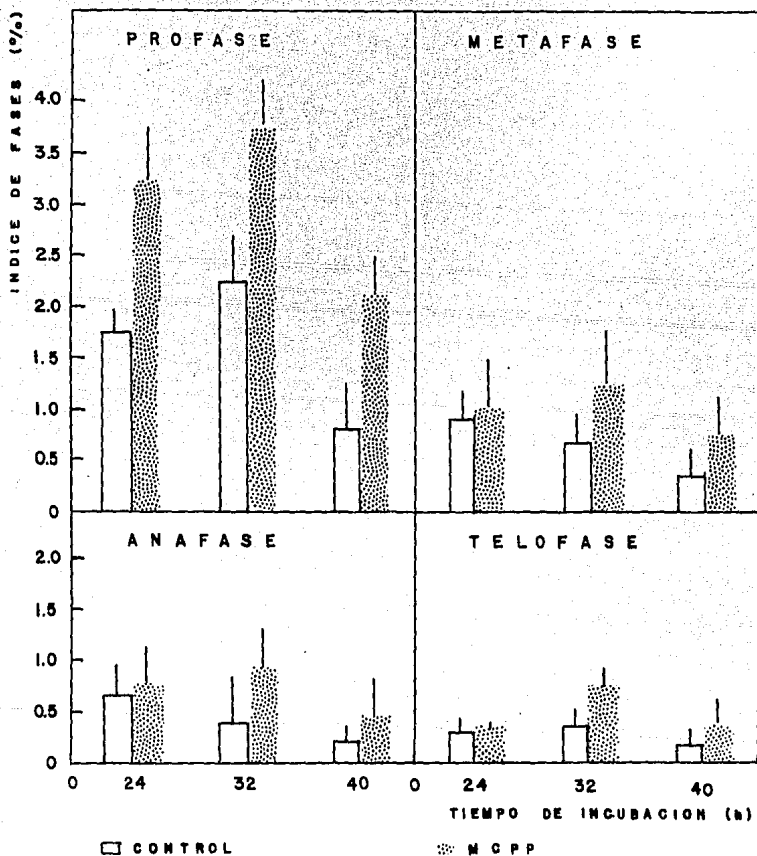
	t	gl	p
Mesocótilo (28 h):	2.45	4	>0.05
Raíces seminales (24 h):	2.17	4	>0.05
Raíz primaria (32 h):	2.21	4	>0.05

TABLA 1. EFECTO DEL MCPP EN EL INDICE MITOTICO EN MERISTEMOS DE MAIZ INCUBADOS POR DIFERENTES PERIODOS (sistema *in vitro*) (DE)

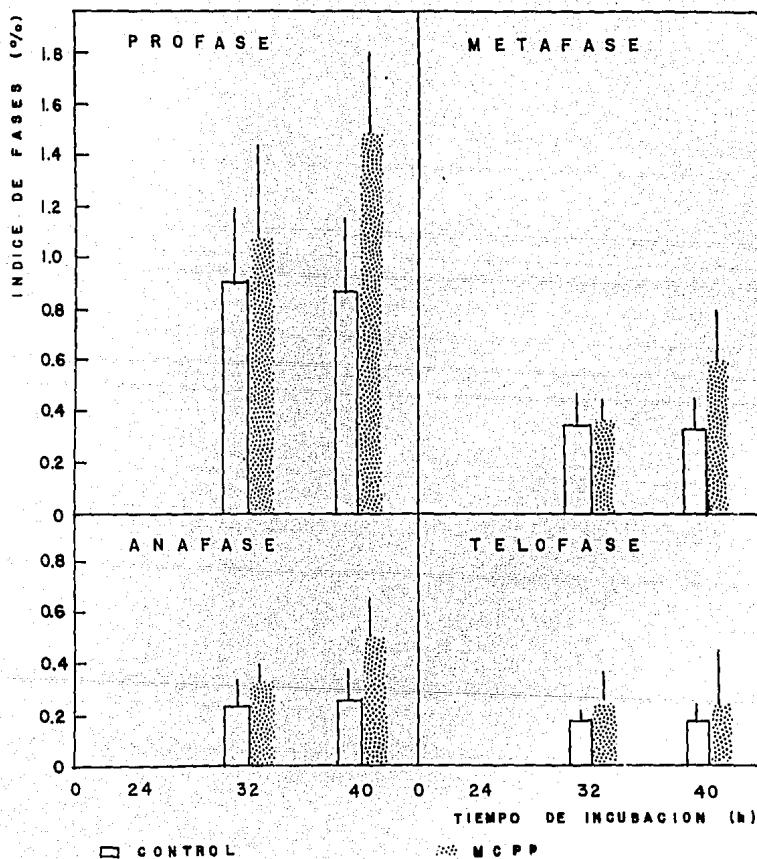
Tiempo (h)	INDICE MITOTICO ( % )					
	Mesocótilo		Raíces Seminales		Raíz Primaria	
	Control	MCPP	Control	MCPP	Control	MCPP
24	3.60±0.45	5.37±0.37	0.0	0.0	0.0	0.0
32	3.77±0.49	6.75±0.59	1.64±0.49	1.97±0.51	0.91±0.34	1.26±0.32
40	1.77±0.51	3.80±0.52	1.60±0.38	2.95±0.50	0.61±0.39	0.48±0.37



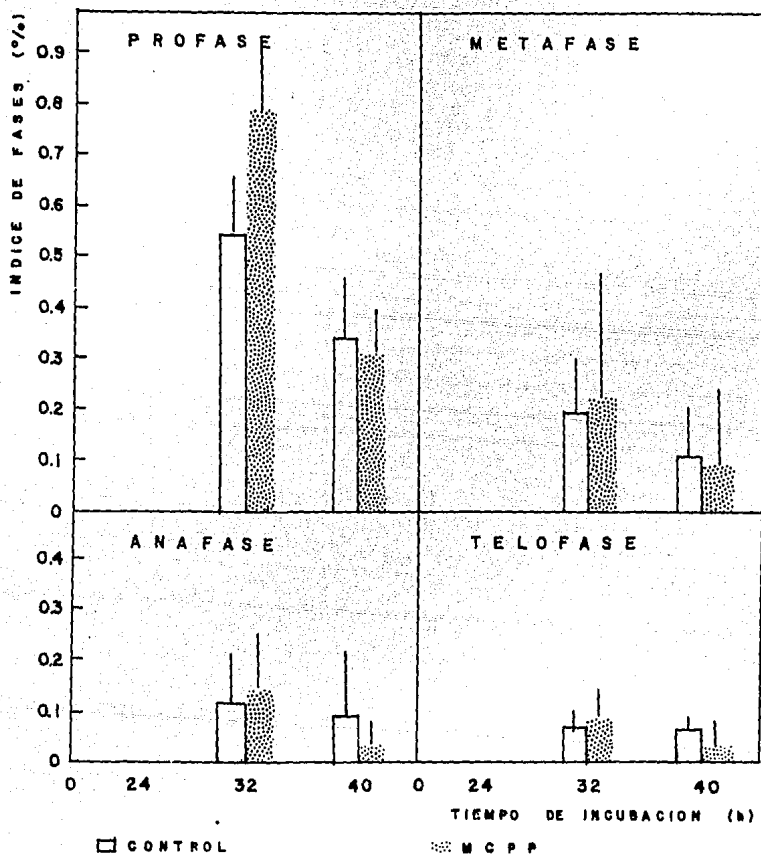
lados ( $p < 0.05$ ); no obstante, las otras fases las incrementa sólo ligeramente. En las raíces seminales (Gráfica 9) y en la raíz primaria (Gráfica 10) también hay un aumento de células en las diferentes fases de la mitosis en presencia del MCPP, siendo mayor este aumento sólo en profase a las 40 h de incubación para el caso de las raíces seminales. Estos datos sugieren que la auxina está actuando preferencialmente en alguna parte del ciclo celular y con selectividad en el tejido.



EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DEL MESOCOTILO. Se emplearon ejes embrionarios incubados por diferentes tiempos (sistema *in vitro*).



EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DE LAS RAICES SEMINALES. Los ejes embrionarios se incubaron por diversos periodos (sistema *in vitro*).



EFFECTO DEL MCPP SOBRE LAS FASES DE LA MITOSIS DE LA RAIZ PRIMARIA. La incubación de los ejes embrionarios se realizó a determinados tiempos (sistema *in vitro*).

#### 4. REACTIVACION DE LA DIVISION CELULAR

Los resultados anteriores muestran que la auxina sintética MCPP afecta la proliferación celular en células embrionarias de maíz durante la germinación. Para determinar el efecto de esta auxina a nivel del ciclo celular es necesario conocer primero la procedencia de las células que reinician su ciclo durante ese periodo de germinación. Para ello, se aplicó un pulso de timidina tritiada durante el tiempo de incubación de ejes embrionarios, previamente disectados en forma manual (sistema *in vitro*).

El material biológico se incubó en un medio nutritivo MS basal por un tiempo de 0 a 14 h, y de las 14 a las 20 h de incubación se aplicó el pulso de timidina tritiada para posteriormente hacer colectas del material cada 4 h, a partir de las 20 hasta las 48 h de incubación. El momento de aplicación de la marca radiactiva se consideró de manera que el análisis involucrara a todas las primeras células que entraran a división; además, los experimentos anteriores señalaron la presencia de estas primeras mitosis entre las 18 y las 20 h de incubación (Gráficas 2 y 3).

Se determinó el índice mitótico marcado y el no marcado, así como el total de núcleos interfásicos marcados en los tejidos meristemáticos del mesocótilo, las raíces seminales y la raíz primaria.

##### 4.1 Autorradiografía de células en mitosis. Ciclo celular

El análisis de los índices mitóticos con o sin incorporación de marca radiactiva, permite identificar la etapa del ciclo celular en la cual las células quedaron detenidas durante la maduración de las semillas. Los datos señalan que los tres tejidos estudiados reinician la división celular durante la germinación,

en forma secuenciada (Tabla 2), lo cual confirma los resultados presentados anteriormente (Gráfica 2). Las primeras figuras mitóticas encontradas en el mesocótilo de las 20 a las 24 h no han incorporado marca en sus núcleos, es decir, que entraron a mitosis sin pasar por la fase S en presencia del isótopo. Es a partir de las 28 h en adelante que las figuras mitóticas presentan marca radiactiva incorporada. El porcentaje de estas células alcanzan un máximo a las 36 h (46.45 %) y luego empieza a disminuir. Inversamente las células no marcadas muestran una disminución en su frecuencia de las 20 a las 36 h (tiempo en el que se observa su valor mínimo: 53.55 %) para posteriormente incrementarse. Estos datos sugieren que las primeras células que reinician la división celular en ejes embrionarios de maíz durante la germinación estaban detenidas en la etapa de  $G_2$ , y corresponde a la población de células de la región del mesocótilo.

Los meristemas de las raíces seminales y primaria muestran un comportamiento diferente. En estos tejidos, la mitosis aparece retrasada con respecto al mesocótilo por 8 y 12 h respectivamente y se observan en forma simultánea figuras con y sin marca. Esta incorporación de timidina tritiada indica que en estos tejidos las primeras células en dividirse durante la germinación provinieron, probablemente, tanto de la fase  $G_1$  como de la de  $G_2$  del ciclo celular. Sin embargo, es evidente que la mayoría de las células que están en división no están marcadas y alcanzan porcentajes mayores del 50 % en los tres tejidos, lo que podría indicar que las poblaciones provenientes de  $G_2$  son mayores que las de  $G_1$ .

Debe notarse que en la raíz primaria sólo se observa una pequeña onda de mitosis (32 a 36 h); no obstante, en los tres meristemas estas mitosis parecen alcanzar un valor máximo al mismo tiempo (36 h), siendo el mesocótilo el tejido con mayor actividad mitótica.

En el mesocótilo y las raíces seminales se observa la coexistencia de las diferentes poblaciones celulares provenientes de

$G_1$  y  $G_2$ , es decir, poblaciones con y sin marca radiactiva incorporada, durante la mayoría del periodo de incubación (28 a 48 h). Sin embargo, no es este el caso de la raíz primaria, en la cual este fenómeno sólo se observa en determinados lapsos (32 a 36 h y 40 h de incubación) (Tabla 2). Dicha coexistencia puede apreciarse para el mesocótilo en la Fig 6.

Es evidente que el tiempo de aparición de las mitosis marcadas es muy cercano para los tres tejidos; 28 h para el mesocótilo y las raíces seminales y 32 h para la raíz primaria (Tabla 2). Esto sugiere que la salida del periodo de quiescencia o reposo de esta población, proveniente de  $G_1$ , es sincrónica para las tres regiones, a diferencia de la salida de las poblaciones provenientes de  $G_2$ , en cuyo caso -como se señaló antes- es secuencial.

#### 4.2 Autorradiografía de células en interfase. Síntesis del ADN

Se cuantificó el porcentaje de núcleos en interfase marcados radiactivamente en las zonas meristemáticas señaladas anteriormente para saber en qué momento, durante la germinación, las células meristemáticas reactivan su síntesis del ADN. Para ello, en el sistema *in vitro*, se analizaron 10,000 núcleos al azar en cada tiempo de incubación y se efectuaron al menos dos repeticiones.

A las 20 h de incubación en las tres regiones estudiadas ya se observan núcleos con incorporación de timidina tritiada (Gráfica 11). El porcentaje más alto a tiempos tempranos, en un periodo de 20 a 28 h, se presenta en el mesocótilo (6 %) y ese valor prácticamente se duplica en el lapso de 36 a 44 h y alcanza un máximo de 14.5 % a las 48 h. Las raíces seminales y primaria muestran un comportamiento muy similar al del mesocótilo, parten con valores del 2 % a las 20 h y muestran sus frecuencias mayores también a las 48 h, con un 14 y 12 %

TABLA 2. INCORPORACION DE H<sup>3</sup>-Td EN CELULAS EN DIVISION DE EJES EMBRIONARIOS INCUBADOS POR DIFERENTES PERIODOS (sistema *in vitro*)

Tiempo de Incubación (h)	MESOCOTILO		RAICES SEMINALES		RAIZ PRIMARIA	
	FRECUENCIA		RELATIVA			
	Indice Mitótico (%) marcado	Indice Mitótico (%) no marcado	Indice Mitótico (%) marcado	Indice Mitótico (%) no marcado	Indice Mitótico (%) marcado	Indice Mitótico (%) no marcado
20	0.0	100.00	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	100.00	0.0	0.0	0.0	0.0
28	26.03	73.97	14.58	85.42	0.0	0.0
32	40.31	59.69	38.10	61.90	3.64	96.36
36	46.45	53.55	37.14	62.86	26.44	73.56
40	43.75	56.25	36.19	63.81	0.0	100.00
44	37.14	62.86	34.09	65.91	0.0	100.00
48	31.87	68.13	38.83	61.17	32.20	67.80



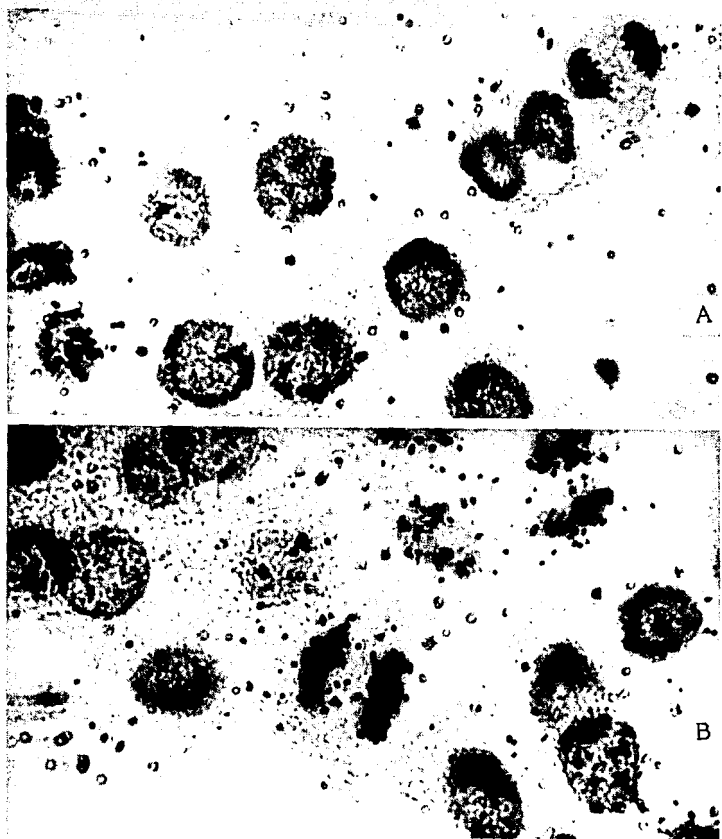


FIG. 6. AUTORADIOGRAFIA DE CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ. Corresponde a la región del mesocótilo a las 22 h de incubación, después de un pulso de timidina tritiada. Células en mitosis (A) sin incorporación y (B) con incorporación de marca radiactiva en sus cromosomas (100X).

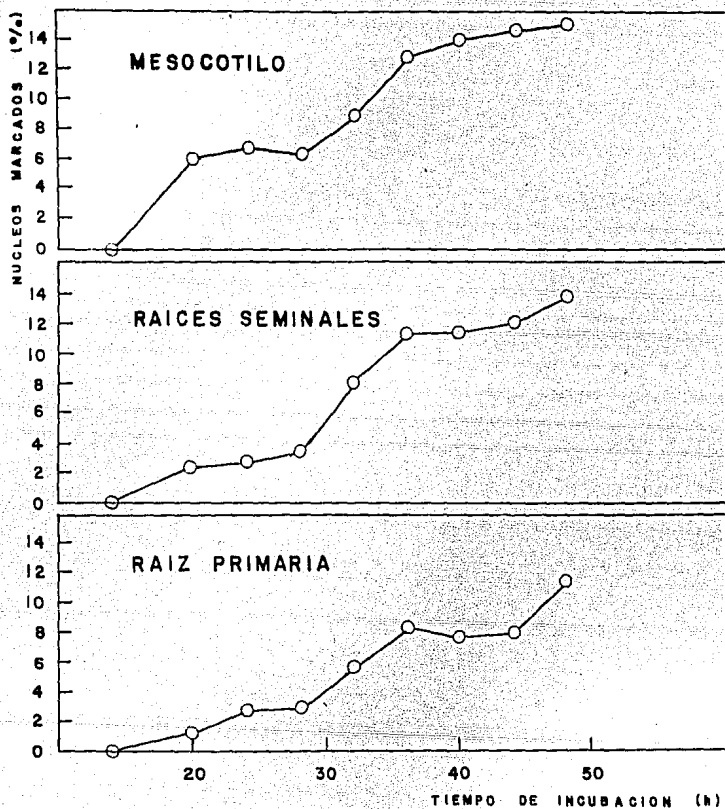
respectivamente. Debe notarse que la aparición de núcleos marcados en los tres diferentes meristemos parece seguir un comportamiento "escalonado", ya que aparece una primera población celular en el periodo de 20 a 28 h y la segunda en el periodo de 36 a 44 h. Lo anterior sugiere la presencia de poblaciones celulares sincrónicas, en los diversos tejidos, cuya mayor actividad de síntesis del ADN la realizan entre las 28 y 36 h de incubación.

La frecuencia de núcleos marcados (Gráfica 11) sugiere que la síntesis del ADN se inicia entre las 14 y las 20 h de incubación en diversas zonas meristemáticas de embriones de maíz.

Es interesante hacer notar que, dentro de una misma preparación para microscopio, se evidencian núcleos marcados ligeramente y núcleos marcados intensamente (Figuras 7 A a D). Al determinarse el porcentaje de cada tipo de núcleo (Tabla 3) se encuentra que, cuando los núcleos marcados comienzan a aparecer (20 h), los tres tejidos presentan solamente núcleos con marca ligera; sin embargo, más tarde se observa un conjunto de núcleos tanto con marca ligera como con intensa. En el mesocótilo este conjunto, con aumento y disminución de porcentajes, prácticamente se mantiene en la mayoría del tiempo de incubación (28 a 48 h) y en las raíces seminales y primaria sólo se observa a las 32 y 36 h.

Al parecer, en los meristemos de las raíces seminales y primaria la misma población de núcleos que aparece primero con poca marca (20 a 36 h) más tarde incorpora una mayor cantidad de timidina tritiada, ya que a partir de las 40 h sólo se observan núcleos con marca intensa. Aunque, por el momento, no se puede descartar la posibilidad de que sea dos poblaciones, una que se evidencia a las 20 h con núcleos marcados ligeramente, y otra a las 32 h que se observa con núcleos marcados intensamente (Tabla 3).

El mesocótilo tiene un comportamiento diferente ya que aparentemente hay al menos dos poblaciones que se suceden



INCORPORACION DE  $H^3$ -Td EN NUCLEOS DE CELULAS DE MAIZ. (Sistema *in vitro*). Se cuantificaron 10,000 núcleos por cada punto experimental y cada uno de ellos corresponde al promedio de dos experimentos.

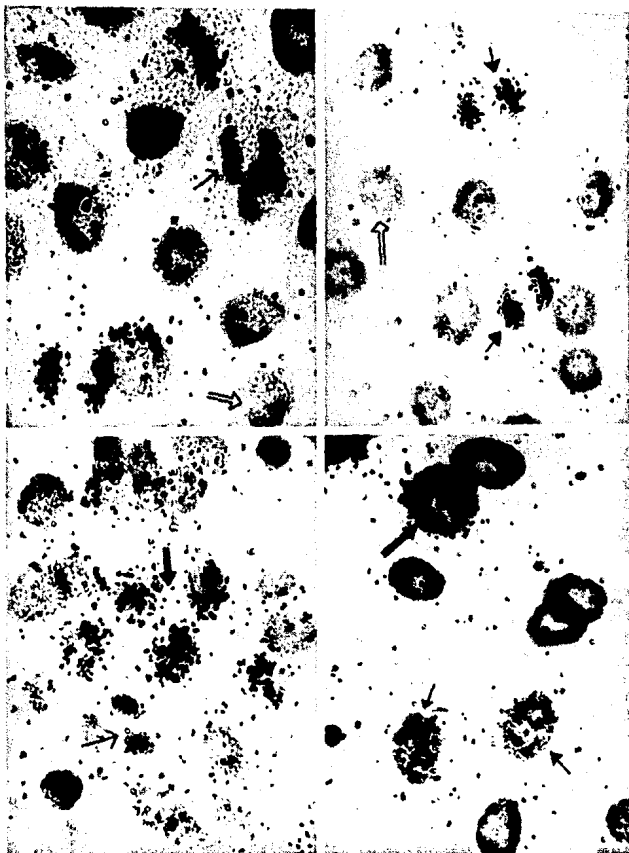


FIG. 8. AUTORADIOGRAFIA DE CELULAS MERISTEMATICAS EN MITOSIS Y EN INTERFASE CON DIFERENTES NIVELES DE INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -Td EN SUS NUCLEOS (100X).

MITOSIS

NUCLEOS

→ Marcadas  
 ⇨ No marcadas

→ Marcados  
 ⇨ No marcados

una tras otra. La primera se observa a las 20 y 24 h con núcleos marcados ligeramente en un porcentaje alto, y cuya frecuencia disminuye entre las 32 y 36 h; la segunda población se reconoce a las 40 h, nuevamente con un alto porcentaje de núcleos marcados ligeramente, y que disminuye visiblemente a las 44 y 48 h de incubación (Tabla 3). Esto último parece confirmar la observación hecha en relación con el índice mitótico de la zona del mesocótilo en ejes embrionarios incubados *in vitro*, en donde se evidencian dos poblaciones celulares que entran al proceso de división celular (Gráficas 2 y 6).

TABLA 3. CANTIDAD DE MARCA RADIOACTIVA INCORPORADA\* EN NUCLEOS DE CELULAS MERISTEMATICAS DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ

Tiempo de Incubación (h)	MESOCOTILO		RAÍCES SEMINALES		RAIZ PRIMARIA	
	% de núcleos con marca ligera	% de núcleos con marca intensa	% de núcleos con marca ligera	% de núcleos con marca intensa	% de núcleos con marca ligera	% de núcleos con marca intensa
20	6.32	0.0	2.49	0.0	1.26	0.0
24	6.98	0.0	2.88	0.0	2.95	0.0
28	5.59	0.91	3.51	0.0	3.62	0.0
32	2.58	6.52	1.04	7.82	0.54	5.35
36	2.95	10.28	0.14	11.43	0.34	8.43
40	10.44	3.65	0.0	11.63	0.0	7.44
44	1.70	12.88	0.0	12.44	0.0	7.80
48	2.44	12.61	0.42	13.55	0.0	11.70

\* Ligera : cada núcleo con 10-60 granos

\* Intensa : cada núcleo con más de 60 granos

## 5. EFECTO DEL MCPP SOBRE EL REINICIO DEL CICLO CELULAR

### 5.1 Efecto del MCPP en el índice mitótico

Para estudiar el efecto de esta auxina sobre el reinicio del ciclo celular de las primeras mitosis durante la germinación de maíz, se realizaron experimentos *in vitro*, y se aplicó un pulso de timidina tritiada en presencia y ausencia del MCPP.

Por autorradiografía se determinaron, en las regiones meristemáticas estudiadas hasta ahora, las frecuencias de células en división con y sin incorporación de marca radiactiva a través del tiempo (Gráficas 12, 13 y 14). Las tres zonas meristemáticas muestran mitosis con y sin timidina tritiada incorporada en sus cromosomas (Gráficas 12 a 14; Figura 8), lo cual sugiere la presencia de diferentes poblaciones celulares que entran a división a partir de diversas fases del ciclo celular. Esta idea se ve apoyada por la coexistencia de células en interfase con diferentes grados de incorporación de radiactividad en sus núcleos (Figura 8).

Las primeras figuras mitóticas que se observan (20 h) se localizan en el mesocótilo y corresponden a mitosis no marcadas (Gráfica 12, parte superior), como se había observado ya en los experimentos anteriores. Es posible sugerir que esas células quedaron detenidas en la fase  $G_0$  del ciclo celular durante la maduración de la semilla y a partir de esa fase entraron a mitosis. El MCPP incrementa el índice mitótico de esta primera población celular en más de un 100 y 140 %, a las 24 y 28 h respectivamente. Una segunda población de células de esta región del mesocótilo, proveniente de  $G_0$ , parece dividirse más tarde, ya que otra onda de mitosis no marcadas se registra a las 36 h; sin embargo, este grupo de células no muestra estimulación por efecto del MCPP, (Gráfica 12, parte superior). Es decir, que la auxina sólo estimula la mitosis en la primera

población de células provenientes de  $G_0$ . A su vez, estos resultados confirman la presencia de dos poblaciones celulares en el mesocótilo, que entran a mitosis durante el periodo de incubación.

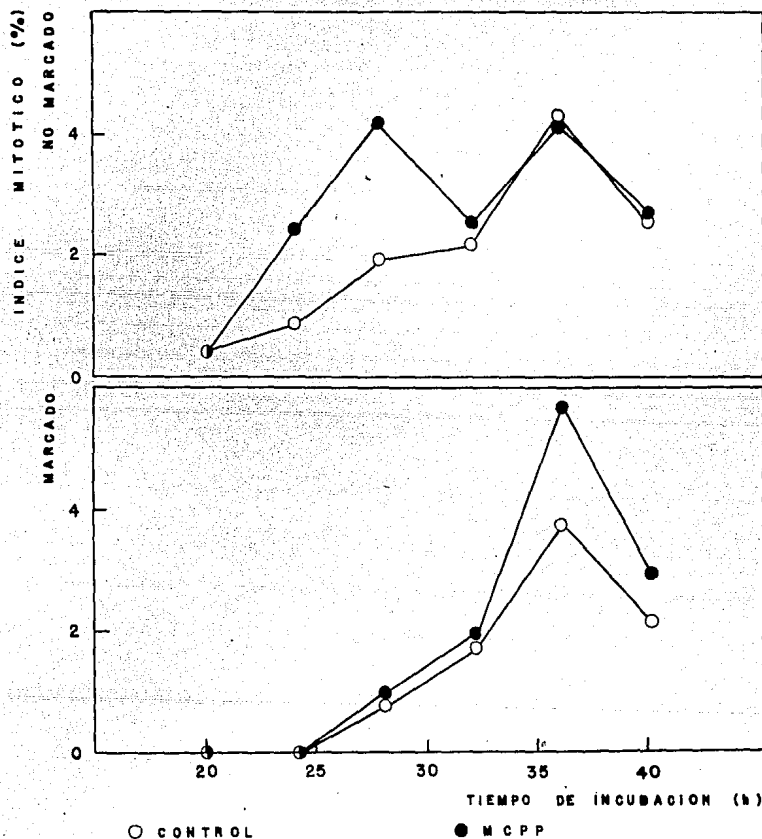
En el mesocótilo, además, se presentan células en división con timidina tritiada en sus núcleos a partir de las 28 h, y se observa una onda de esta población hacia las 36 h de incubación (Gráfica 12, parte inferior). Es probable que estas células hayan reiniciado su ciclo celular a partir de la fase  $G_1$ , pasando después a través de la fase S en donde incorporaron la marca radiactiva. Esta población resulta ser estimulada por el MCPP en el periodo de 36 a 40 h cuando se presenta el mayor índice mitótico, pero no en su inicio (24 a 32 h).

En las raíces seminales y en la raíz primaria se encuentran células en división con y sin timidina tritiada incorporada en sus núcleos, indicando que también han sido detenidas poblaciones del tipo  $G_{01}$  y  $G_{02}$  (Gráficas 13 y 14). En ambos tejidos las primeras células que entran a mitosis son mayoritariamente no marcadas, aunque también participan mitosis marcadas en porcentajes muy bajos a las 28 y 32 h respectivamente. La presencia de auxina en el medio causa un ligero incremento en el índice mitótico en ambos tejidos, así como en el índice mitótico marcado a las 36 h de incubación; este último resultado coincide con los datos obtenidos para el mesocótilo (Gráfica 12). No obstante, estos aumentos no son significativos.

## 5.2 Efecto del MCPP en el índice de fases

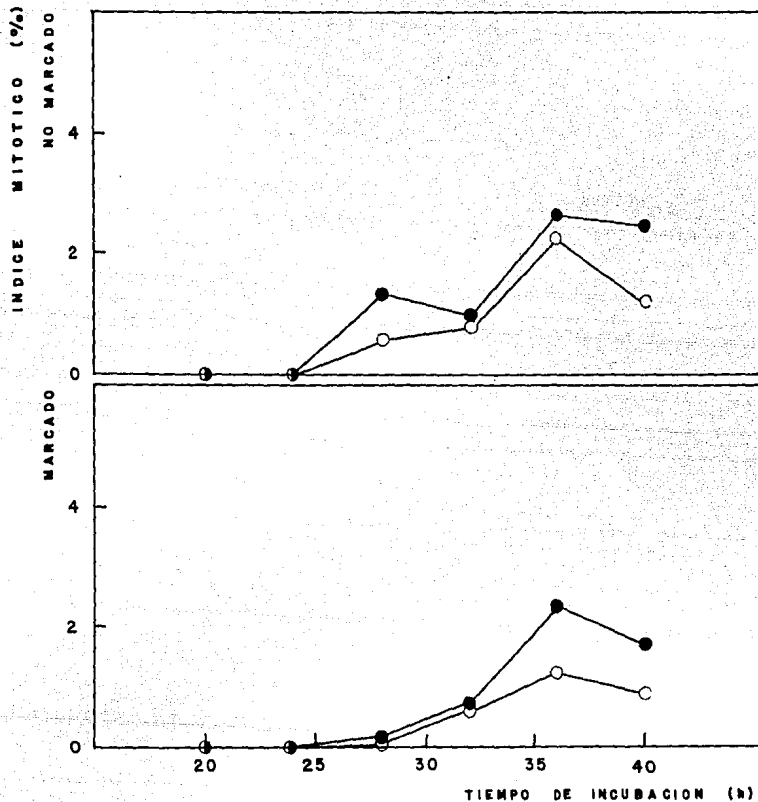
Para analizar más específicamente el efecto del estímulo del MCPP en la mitosis, a partir de las Gráficas 12 a 14 se tomaron como ejemplos aquellos tiempos de incubación en los que el índice mitótico resultó incrementado en presencia del MCPP, en los tres diversos meristemos (Gráficas 15 y 16).





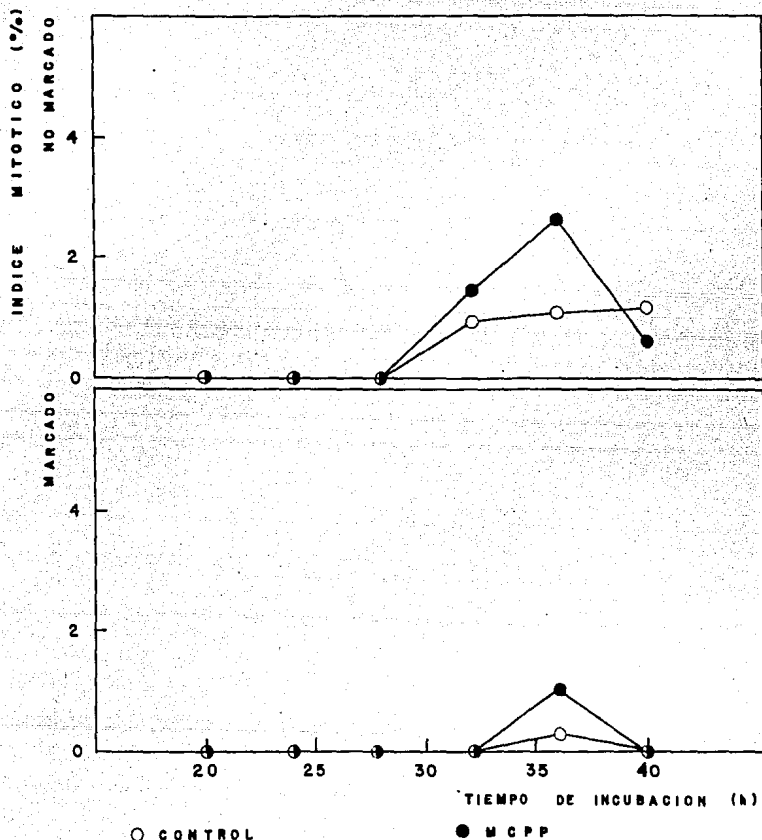
EFFECTO DEL MCPP EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DEL MESOCOTILO

	$\chi^2$	gl	p
IM No marcado:	0.70	1	> 0.05
IM Marcado:	0.18	1	> 0.05



○ CONTROL ● MCPP  
 EFECTO DEL MCPP EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LAS RAICES SEMINALES

	$\chi^2$	gl	p
IM No marcado:	0.16	1	>0.05
IM Marcado:	0.17	1	>0.05



EFFECTO DEL MCPP EN EL REINICIO DE LA DIVISION CELULAR EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ PRIMARIA

	$\chi^2$	gl	p
IM No marcado:	0.36	1	>0.05
IM Marcado:	0.17	1	>0.05

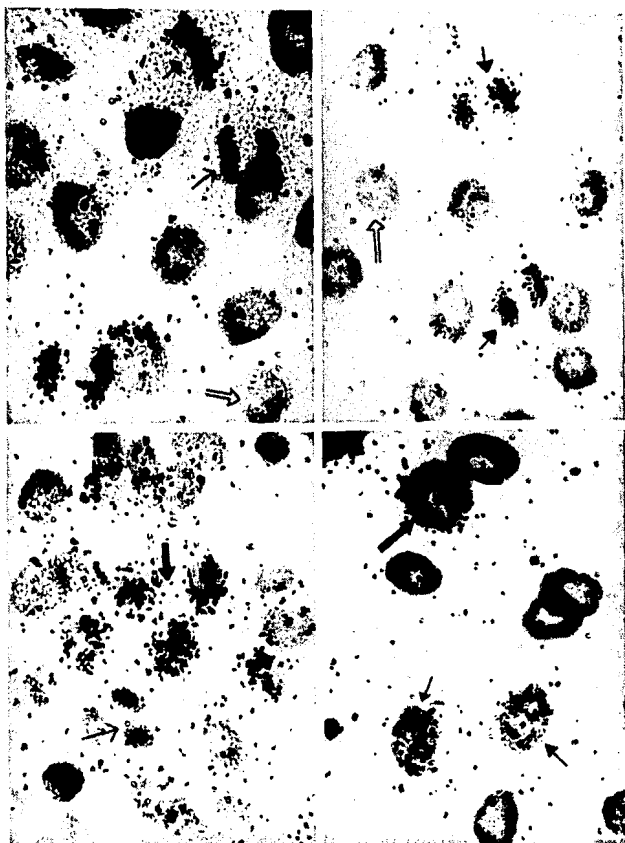


FIG. 8. AUTORRADIOGRAFIA DE CELULAS MERISTEMATICAS EN MITOSIS Y EN INTERFASE CON DIFERENTES NIVELES DE INCORPORACION DE  $H^3$ -Td EN SUS NUCLEOS (100X).

MITOSIS

NUCLEOS



Marcadas



Marcados



No marcadas



No marcados

La auxina, al estimular la mitosis, aumenta en forma preferencial el número de células en profase en los tres tejidos estudiados, independientemente de la procedencia de las células, ya que el resultado es el mismo tanto para las mitosis que no han incorporado la marca en sus núcleos como para las que la han incorporado; no obstante, aumenta ligeramente el número de células en las otras fases de la mitosis. Al respecto, con la prueba de  $\chi^2$  se encuentra que, para los diversos meristemas ( $p > 0.05$ ), los valores obtenidos no son significativamente diferentes con respecto al control.

Estos datos señalan que el MCPP afecta a la mitosis sólo una vez que se presenta y permite que haya un mayor número de células en profase. Esta auxina no adelanta el tiempo de aparición de las mitosis, ya que éstas se presentan exactamente al mismo tiempo en el control y en el tratado con MCPP y no antes; es decir, que no acelera el paso de las células hacia mitosis.

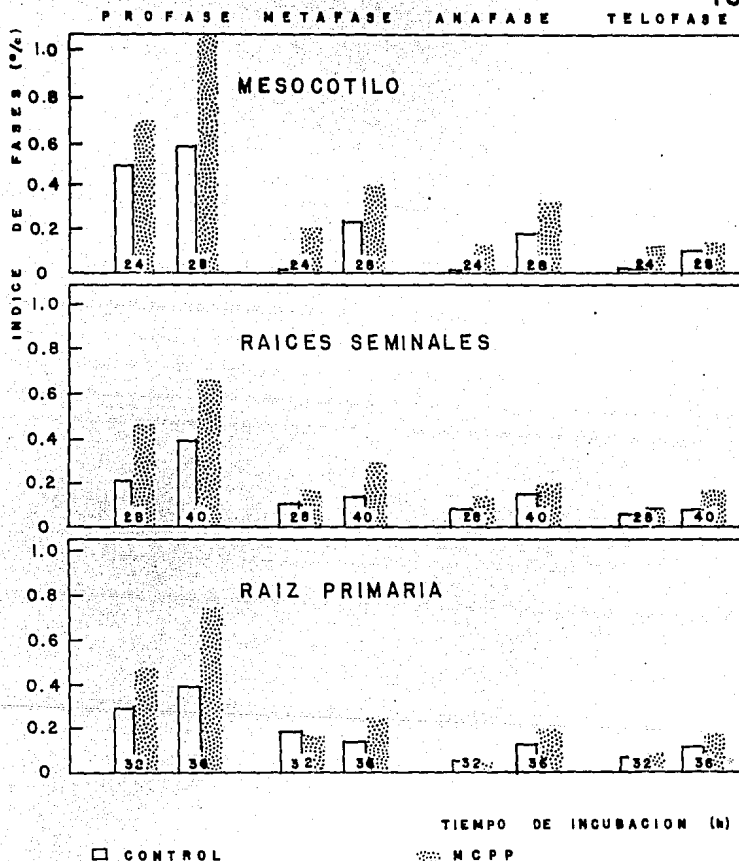
### 5.3 Efecto del MCPP en células en interfase

Por autorradiografía se determinó el porcentaje de núcleos marcados con timidina tritiada en las tres diferentes zonas meristemáticas analizadas hasta ahora, en presencia y ausencia de la auxina sintética.

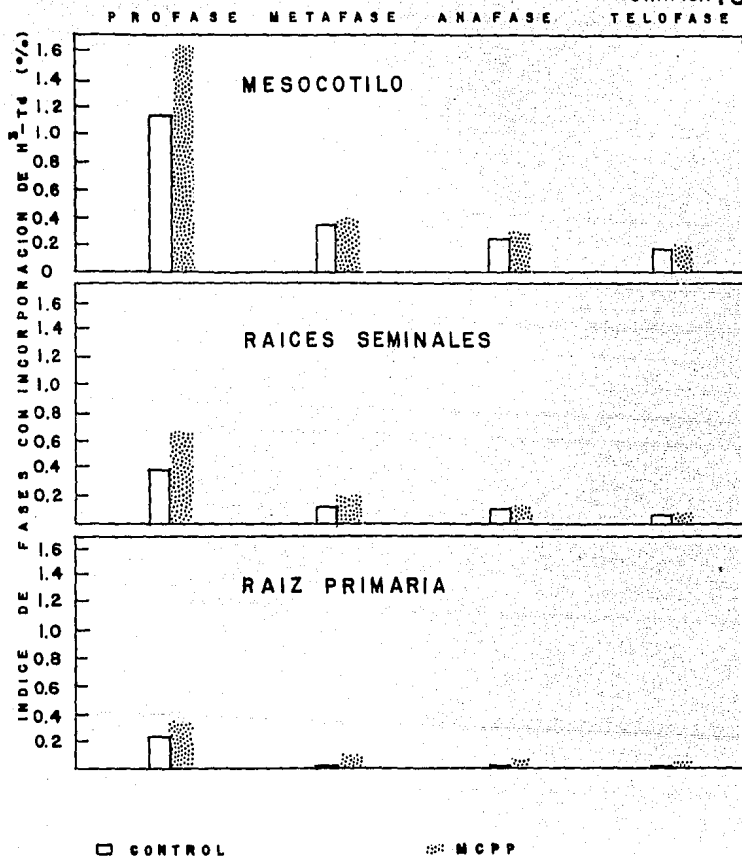
El precursor radiactivo se aplicó de las 14 a las 20 h de incubación y el muestreo se realizó a partir de esta hora hasta las 40 h. En cada punto experimental se cuantificaron 10,000 núcleos en interfase. Los valores mostrados corresponden a un promedio de dos experimentos (Gráfica 17).

Los datos obtenidos señalan que a las 20 h de incubación ya hay incorporación de marca radiactiva en los núcleos, tanto en el lote control como en el tratado. El porcentaje de estos núcleos marcados se incrementa a lo largo del periodo de incu-

GRAFICA 15



ESTIMULO DEL MCPP EN EL INDICE MITOTICO NO MARCADO. Los valores graficados (promedio de dos experimentos) corresponden a aquellos tiempos de incubación en los que hay un mayor número de células en división en presencia de la auxina; estos tiempos son diferentes para cada uno de los tejidos.



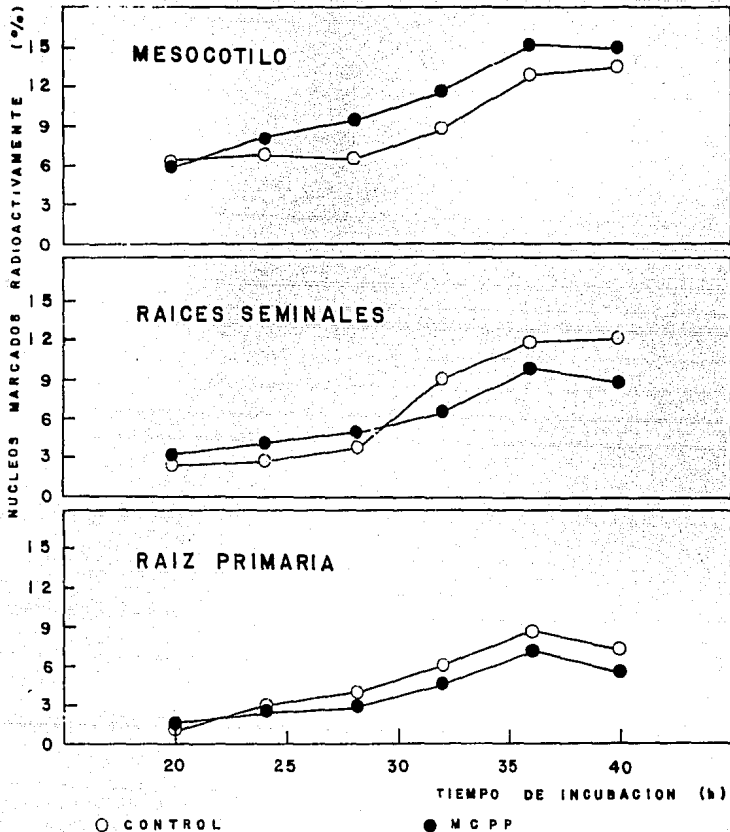
ESTIMULO DEL MCPP EN EL INDICE MITOTICO MARCADO RADIATIVAMENTE. Todos los valores (promedio de dos experimentos) corresponden a un periodo de 36 h de incubación, tiempo en el que se presenta un incremento en el número de mitosis en presencia del MCPP.

bación y alcanza un máximo aproximadamente de las 36 a las 40 h, con un 13 y 12 % para el mesocótilo y las raíces seminales respectivamente y 9 % para la raíz primaria.

El tratamiento con el MCPP incrementa el número de núcleos con incorporación de timidina tritiada en la zona del mesocótilo; este efecto es visible entre las 28 y las 48 h de incubación. Sin embargo, los resultados no son significativamente diferentes al control (por ejemplo a las 28 h:  $X^2=0.45$ ;  $p>0.05$ ;  $gl=1$ ).

En el caso de los meristemas de las raíces seminales y la raíz primaria, la auxina no tiene efecto al inicio del periodo analizado (20 a 28 h). Posteriormente hay una disminución en la frecuencia de núcleos marcados, entre las 32 y 40 h de incubación. Esta disminución no es significativamente diferente, al considerar una  $p>0.05$ , ya que para las raíces seminales y la primaria a las 40 h la  $X^2=0.66$  y  $0.62$  respectivamente.





EFFECTO DEL MCPP EN LA INCORPORACION DE  $H^3$ -Td EN NUCLEOS EN INTERFASE DE CELULAS MERISTEMATICAS DE MAIZ. Cada punto representa el promedio de dos experimentos. La prueba estadística señala que no hay una diferencia significativa entre los lotes control y los tratados, para cada tejido.

## SECCION V DISCUSION

### 1. GERMINACION Y EFECTO DE LA AUXINA SINTETICA MCPP

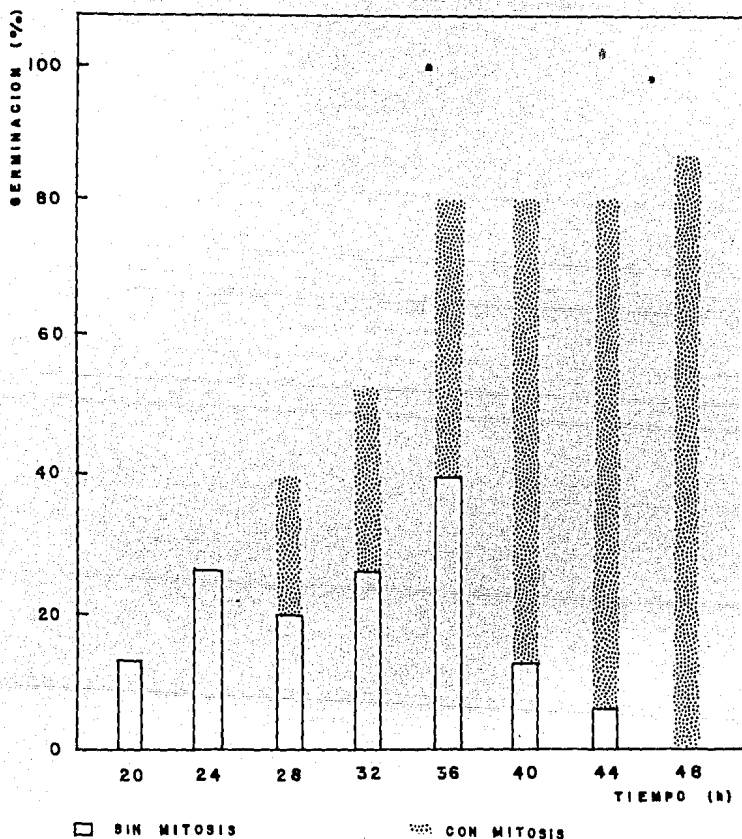
Los datos sobre germinación y aparición de mitosis en la radícula mostrados en las Gráficas 1, 2 y 3, sugieren que hay una serie de eventos que conducen a la protrusión de la radícula, que se realizan antes de que las células meristemáticas del primordio de la raíz primaria entren a mitosis.

Es evidente que en el periodo desde el inicio de la incubación hasta las 28 h (Gráfica 3) no hay mitosis en la raíz primaria, no obstante que a las 18 h ya hay semillas germinadas y a las 28 h hay alrededor de un 30 % de germinación (Gráfica 1). Esto sugiere que la reiniciación de la división celular es un evento tardío en la germinación, de manera que ésta se realiza por elongación celular, como se ha reportado previamente para otros cereales (3).

Esto puede corroborarse a través de los resultados mostrados en la Gráfica 18. En este caso se determinó la presencia de mitosis en las raíces principales de semillas germinadas. Los resultados señalan que a las 20 y 24 h ninguna de las semillas presentan mitosis; es a partir de las 28 h en que éstas se hacen evidentes. En este caso, el índice mitótico se incrementa conforme avanza el tiempo de incubación (Gráfica 3), porque más células entran en mitosis y no porque haya más semillas germinadas, ya que de 28 a 36 h el 50 % de las semillas ger-

minadas tiene mitosis y el otro 50 % no tiene (Gráfica 18). A su vez, a partir de las 36 h prácticamente han germinado todas las semillas, la mayoría de las cuales presentan mitosis.

Al analizar el efecto de la auxina MCPP sobre la germinación se encontró que aparentemente hay un mayor número de semillas germinadas en presencia de la auxina entre las 24 y 30 h de germinación y no antes. Este periodo coincide con el tiempo en que ya hay mitosis en la raíz primaria, las cuales se evidencian en los dos sistemas de incubación utilizados (Gráficas 2 y 3). Algunos autores (9, 17) han señalado una relación entre auxinas y división celular. No obstante, los resultados presentados particularmente en la Gráfica 18 no permiten profundizar más acerca de dicha relación.



PRESENCIA DE MITOSIS EN LA RAÍZ PRIMARIA DE SEMILLAS GERMINADAS DE MAÍZ. Se emplearon lotes de 15 semillas y se realizaron 3 repeticiones. En cada punto experimental se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas (protrusión de la radícula) y se determinó en éstas la presencia de mitosis.

## 2. CINETICA DE LA DIVISION CELULAR

La cinética de la división celular en los diferentes meristemos de ejes embrionarios de maíz crecidos bajo los dos sistemas de incubación denominados en el trabajo como *in vitro* e *in vivo*, muestran un patrón muy similar. De manera que parece haber un orden programado entre esos tejidos para reiniciar el ciclo celular. Las primeras figuras mitóticas se presentan en la región del mesocótilo, alrededor de las 18 a las 22 h después de la imbibición, seguida por las raíces seminales y la raíz primaria.

Este reinicio de la mitosis en forma programada es evidente a pesar de que el sistema de incubación *in vitro* muestra actividad mitótica antes que el sistema *in vivo*. Muy probablemente este retraso está relacionado con el hecho de que el agua entra en contacto con el eje embrionario más rápidamente en aquellos aislados, que en el caso de la incubación de semillas completas, en las cuales la testa es la primera estructura en humedecerse.

Como se mencionó anteriormente, el primer tejido que reinicia la división celular es el mesocótilo y no la raíz primaria como lo han señalado Van de Walle y Bernier (173) y Stein y Quastler (174) para maíz. Sin embargo, los resultados obtenidos son consistentes con los encontrados por Picklum (22) quien señala que la mitosis en dicho cereal se presenta primero en el mesocótilo y a las 24 h de imbibición en la radícula.

En los tres meristemos estudiados, la división celular parece ser sincrónica ya que, como se observa en las Gráficas 2 y 3, en todos los tejidos analizados e independientemente del sistema de crecimiento utilizado (*in vitro* o *in vivo*), las curvas del índice mitótico con respecto al tiempo muestran un pico lo cual indica que se tiene bajo estudio una sola población celular. La región del mesocótilo en el sistema *in vitro* tiene un comportamiento diferente pues se observan dos poblaciones que entran

a división durante el periodo de crecimiento (Gráfica 2), fenómeno que se confirmó al determinar el porcentaje de mitosis marcadas en el mismo sistema (Gráfica 12).

Por otro lado, en relación a las fases de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) se ha observado que en algunos meristemas de raíz hay asincronía durante la germinación, como se ha demostrado en *Vicia faba* (175) y en *Allium* (176). Al respecto, Sans y colaboradores (50) sugieren que algo más que la variabilidad genética (probablemente una absorción irregular de agua), es la causa de tal asincronía, ya que el desarrollo de raíces genéticamente idénticas en un solo bulbo es también un evento asincrónico.

También en ambos sistemas de incubación la división celular se hace evidente como poblaciones de células entrando a mitosis en tiempos específicos (Gráficas 2 y 3), cuya frecuencia de aparición abarca un tiempo aproximado de 8 h, tanto en el mesocótilo como en las raíces seminales. Gonthier y colaboradores (177), han encontrado en el meristemo del ápice del tallo de *Sinapis alba* poblaciones celulares detenidas, las cuales, al ser estimuladas a dividirse, lo hacen en ondas mitóticas (178). Asimismo, ellos han sugerido también que en el meristemo coexisten células ciclando (dividiéndose) lenta y rápidamente. De manera similar, la presencia de ondas mitóticas (separadas por periodos de 6 h) se han detectado en *Allium* (179) probablemente debido a la cantidad o a la posición de las células, en diferentes puntos del ciclo celular.

Por otro lado, en los tejidos del eje de maíz, la proporción de las fases de la mitosis es constante a través del tiempo de incubación estudiado. La profase fue la etapa que se presentó en mayor proporción. Esto concuerda con el hecho de que la longitud de las fases se relaciona con la fracción (porcentaje) de células encontradas en cada fase en un tiempo determinado (50). Los resultados sugieren que la profase (con un 50 a 60 %) tiene una mayor duración que las demás fases, las cuales aparentemente presentan una duración similar entre ellas

a través del tiempo (15 a 20 %) (Gráficas 4 y 5). Estos datos parecen ser consistentes con los obtenidos para ciclos celulares de diferentes gramíneas, entre otras muchas (41). A su vez esta constancia en el porcentaje de células en cada fase señala la existencia de un flujo celular continuo para cada etapa, es decir, células ciclando constantemente, en una misma proporción.

### 3. EFECTO DEL MCPP EN LA DIVISION CELULAR

Se ha señalado que las auxinas están implicadas en el proceso de división celular (9, 17, 18, 159) y en los resultados de las Gráficas 6 y 7 se evidencia que la auxina sintética MCPP estimula la mitosis de primeras células que reinician el proceso. Por el hecho de que sean mayores los incrementos producidos por el MCPP en el sistema *in vitro*, ya que en el sistema *in vivo* estos incrementos no son significativos, se puede suponer que se debe a un efecto de concentración (180), ya que en el sistema *in vitro* la auxina penetra más fácilmente que en el sistema *in vivo*, considerando en éste la testa y el endospermo de la semilla. No obstante, estos datos del índice mitótico aunados a los obtenidos sobre la cinética de la división celular en ambos sistemas de crecimiento (Gráficas 2 y 3), validan, con sus respectivas reservas, el empleo del sistema *in vitro* para esta clase de estudios.

El MCPP mostró capacidad para acelerar la iniciación de la división en las células de los embriones en germinación. Su efecto parece ser sobre las células ya reactivadas que iniciaron el proceso. Este efecto se mostró en forma diferencial: estimula el proceso en horas tempranas y lo inhibe en algunos casos en horas tardías (Gráficas 6 y 7). Además, este efecto fue selectivo, pues no todos los tejidos embrionarios respondieron en la misma forma no con igual intensidad, al efecto de la auxina. De hecho, la auxina incrementó la mitosis en las células del mesocótilo y ligeramente en las de las raíces seminales, pero no en las de la raíz primaria (Gráfica 6). Por lo que su efecto probablemente depende del tejido "blanco" (181) y de la fase del ciclo en que se encuentran las células (10). Al respecto, algunos autores (180) han señalado que las auxinas pueden ejercer una acción diferencial debido a un efecto de concentración; por ejemplo, ejercer una inhibición sobre el desarrollo de la raíz, pero no sobre el del tallo. Otros investigadores (181) sugieren que están involucrados el número, distribución y tipo de receptores para auxinas presentes en la membrana celular.



La inhibición en el crecimiento de la raíz ocasionado por diferentes auxinas (natural y sintéticas) se ha señalado en varios reportes. Mulkey y colaboradores (182) han sugerido que esto puede deberse a una producción de etileno inducida por la auxina natural AIA, ya que sólo se ha inducido el crecimiento de raíces de maíz intactas en presencia de AIA, después de un tratamiento de las mismas con inhibidores de la biosíntesis de etileno.

Se ha sugerido (68) que el ciclo celular podría modularse por fosforilación de variantes de histonas específicas de cada fase del ciclo celular. Al respecto, el MCPP es capaz de estimular la fosforilación de proteínas, y entre ellas selectivamente la de las histonas, dicho incremento es mayor entre las 21 y las 24 h de germinación (183), coincidente con el estímulo observado en la división celular (Tabla 1). En levaduras se han aislado y caracterizado genes que codifican para proteínas quinasas que pueden regularse por fosforilación, de manera que se ha sugerido que la fosforilación de un grupo específico de proteínas puede controlar el paso de  $G_1$  a S y de  $G_2$  a M (93, 184, 185), lo cual, de acuerdo con Van't Hof (10) <sup>2</sup>argumenta la posibilidad de que genes similares puedan funcionar en células de plantas superiores.

El efecto del MCPP observado en los resultados obtenidos en este trabajo, podría explicarse si se considera la proporción de células en diversas fases del ciclo celular reactivadas durante la germinación. Es decir, la proporción de células provenientes de las etapas pre- y post-duplicativas evidenciadas a partir de la aplicación de un precursor radiactivo, como se señalará más adelante con los experimentos de autorradiografía.

El hecho de que la auxina sintética estimule la mitosis incrementando preferencialmente a las células en la etapa de profase (Gráficas 8, 9 y 10), podría suponer una posible acción de la auxina sobre el llamado "punto menor" de control del ciclo celular, localizado en la etapa de profase y señalado por diversos autores (104, 105, 106).

#### 4. REACTIVACION DEL CICLO CELULAR Y EFECTO DEL MCPP

Resulta interesante que al comienzo de la reactivación de la proliferación en el sistema *in vitro* descrito aquí, sean coincidentes los incrementos tanto en el índice mitótico como en el índice mitótico marcado (Gráficas 12, 13 y 14). Esto puede explicarse por el hecho de que las células en los meristemas durmientes (quiescentes) están en ambas etapas pre- y post-duplicativas con contenidos de ADN de 2C y 4C. Posterior al incremento de ambos índices hay una disminución sucesiva de los mismos (Tabla 2 y Gráficas 12, 13 y 14), la cual es concomitante con un incremento en el número de núcleos marcados, es decir células en S o tal vez  $G_2$  (Gráfica 11), lo que señala un flujo celular continuo durante la reactivación de la mitosis. Este flujo celular es característico de los sistemas en proliferación constante, debido a la presencia de células ciclantes (186).

La relación de marca radiactiva en las primeras mitosis observadas en los ejes embrionarios aislados, indica que la población celular en estos tejidos es heterogénea en cuanto a la fase del ciclo de división celular de la que proceden. La primera y más abundante población que inicia la división celular en la germinación corresponde a  $G_2$  para los diferentes tejidos, ya que esas células, al no haber ya duplicado su ADN no incorporaron timidina tritiada en sus núcleos; posteriormente, le sigue una población de menor tamaño procedente probablemente de  $G_1$ , la cual se muestra como mitosis marcadas (Tabla 2). Esta situación dual de coexistencia de células en dos fases diferentes del ciclo se ha reportado en otros tejidos vegetales (3, 6, 10, 50, 151, 187), pero no se saben las razones de ello (3). No obstante, la proporción de células detenidas en  $G_1$  y  $G_2$  varía en los diferentes vegetales (188), y al parecer es específica de la especie (10).

En relación a las mitosis marcadas cabe señalar que el tiempo de aparición para los diferentes meristemas es muy cercano

(Tabla 2), lo que sugiere que la salida de la quiescencia de esta población proveniente muy probablemente de  $G_1$ , es sincrónica para los tres tejidos, a diferencia de la salida de las poblaciones provenientes de  $G_2$ , en cuyo caso parece ser secuencial (Gráficas 12, 13 y 14).

En relación al efecto del MCPP, los resultados muestran que esta auxina provoca un incremento en particular de las mitosis no marcadas -es decir, aquellas células provenientes de  $G_2$  (a las 21 y 28 h en el mesocótilo)-. Sin embargo, no incrementa el número de las mitosis marcadas, sino hasta las 36 h, lo que puede sugerir que se trata de un efecto sobre la misma o tal vez otra población que salió de  $G_2$  -es decir, que las primeras células que re-entraron al ciclo celular inicialmente provenían de  $G_2$  y pasaron por un segundo ciclo, de manera que incorporaron la marca radiactiva-, las cuales se observan a las 36 h como mitosis marcadas. Esto señala que, aparentemente, el MCPP tiene un efecto preferencial sobre células provenientes de  $G_2$ . Es decir, que modula el proceso de división celular en forma diferencial, lo que probablemente se propicia por la heterogeneidad fisiológica de las poblaciones presentes. Al respecto, algunos autores (187) han mencionado la posibilidad de que la respuesta diferencial de células provenientes de  $G_1$  o  $G_2$ , a la estimulación por auxinas, podría deberse a las poblaciones celulares heterogéneas presentes en el tejido. Esto concuerda con los resultados presentados por Nishi y colaboradores (159), quienes demuestran que las auxinas inducen mitosis en células detenidas en  $G_1$ , mientras que en los datos encontrados por Everett y colaboradores (189) no hay esta estimulación en células creciendo activamente. Esta respuesta diferencial también se encuentra en trigo, debido al diferentes estado de madurez de las células (190). Todos estos datos apoyan la idea de que las células con diversas características fisiológicas, dan una respuesta diferente a un estímulo externo (191). Por lo tanto, puede suponerse que el estado fisiológico de las células -como se ha señalado para *Helianthus* (156)-, más que su localización dentro del tejido (8), determina su capacidad de respuesta a un estímulo dado (156, 192). En relación a esto,

se ha encontrado en los meristemos apicales de embriones de maíz, que aún cuando las células tengan una misma posición dentro de un solo meristemo, tienen destinos completamente diferentes durante la germinación (193).

Estos datos concuerdan con la hipótesis de Van't Hof (10) que sugiere dos puntos principales de control del ciclo celular. En el caso del maíz en germinación, parece que la auxina es capaz de estimular células en  $G_2$ , pero no células en  $G_1$ ; aunque otros autores (159) han demostrado que las auxinas controlan, en otros tejidos, células detenidas en  $G_1$ .

En el caso de otros fitorreguladores se ha señalado que su principal efecto es a nivel de la duración del ciclo celular; dichos compuestos acortan específicamente la duración del periodo  $G_1$ , lo que podría, según los autores, reflejar alguna función fisiológica involucrada con el tránsito del periodo  $G_1$  a S (8).

Al considerar que la duración total, así como las de las fases del ciclo celular, puede estimarse a través de estudios autorradiográficos cuantificando el porcentaje de mitosis marcadas (42, 43), se intentó obtener dicha información para las células meristemáticas de maíz.

Debido a que en esta clase de estudios autorradiográficos el intervalo entre la adición de la marca radiactiva y su aparición en las mitosis es una medida del periodo  $G_2$ , sólo puede señalarse que en los tres meristemos la fase  $G_2$  es muy larga, la cual aparentemente no es afectada en presencia del MCPP. Sin embargo, no es posible hacer determinaciones exactas sobre la duración total o las de las fases del ciclo celular, ya que durante la reactivación de la mitosis hay células que provienen tanto de  $G_1$  como de  $G_2$ . De esta manera, aunque se dió un pulso de timidina tritiada durante la incubación, no fue posible obtener un 100 % de mitosis marcadas, como se requiere en esta clase de estudios, ya que siempre hubo un determinado porcentaje de células no marcadas debido a su procedencia, es decir de  $G_2$ . Con base en los resultados obtenidos (Gráficas

7, 12, 13 y 14) sólo se puede mencionar que el MCPP no adelanta el ciclo celular en ninguno de los tres meristemos, ya que su efecto sólo se manifiesta una vez que se ha iniciado la mitosis.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre el porcentaje de núcleos marcados señalan que la síntesis del ADN, considerada con base en la incorporación de timidina tritiada en los núcleos, se inicia poco antes de la germinación (Gráficas 1 y 11). Al parecer, esta síntesis apenas se inicia entre las 14 y las 20 h de incubación en los diferentes meristemos de maíz y presentan su mayor actividad entre las 28 y 36 h de incubación. Estos datos son consistentes con los obtenidos en otros trabajos con maíz, donde se encontró una síntesis duplicativa del ADN alrededor de las 15 h de incubación (194).

En presencia del MCPP se encuentra que los núcleos marcados aparecen al mismo tiempo que en los controles, aunque aparentemente en una mayor proporción, la cual no resulta ser significativa, lo que podría sugerir nuevamente que esta auxina no adelanta el ciclo celular de células meristemáticas de maíz.

Al considerar la metodología empleada en este trabajo no es posible determinar con exactitud la reactivación de células a partir de la fase S. Sin embargo, no se puede descartar esta posibilidad, ya que desde las 20 h de incubación se aprecian núcleos marcados en los diversos tejidos, los cuales aparecen primero marcados ligeramente y posteriormente se muestran marcados intensamente. Algunos autores (50, 195), al emplear técnicas citofluorométricas, han encontrado en meristemos durmientes una fracción de células en la fase S, particularmente en el periodo tardío. Respecto al nivel de incorporación de timidina tritiada se han encontrado, en meristemos de *Allium*, células marcadas ligeramente, en cuyo caso, representan células sintetizando ADN en baja proporción (196).

Al parecer, en la región del mesocótilo coexisten a través del tiempo, dos tipos de núcleos: con marca ligera y con marca

intensa (Tabla 3). Esto podría señalar la presencia de dos poblaciones, una de ellas que se inicia desde las 20 h, la cual atraviesa por S -donde incorpora la marca- y por G<sub>2</sub>, hasta llegar alrededor de las 32 a las 36 h, lo cual coincide con el tiempo en que se evidencia el mayor índice mitótico marcado. Alrededor de las 40 h podría iniciarse la segunda población, ya que hay un elevado incremento en el porcentaje de núcleos marcados ligeramente. En los otros dos meristemas, aparentemente, hay una sola población que arranca alrededor de las 20 h, y se inicia con núcleos marcados ligeramente, los cuales conforme avanzan por el ciclo incorporan mayor cantidad de marca. La presencia de estas posibles poblaciones podría sugerir que las células reinician su ciclo gradualmente, es decir, que están detenidas en diferentes puntos del ciclo celular.

## SECCION VI CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en el presente trabajo permiten formular algunas conclusiones, como son las siguientes:

1. La germinación en maíz, considerada como la protrusión de la radícula, no se realiza por división celular, sino por elongación de tejidos.

2. Durante la germinación, la división celular se inicia en forma programada, siendo la región meristemática del mesocótilo la primera en realizar el proceso.

3. La división celular se efectúa en forma sincrónica. En cada meristemo hay una sola población capaz de iniciar la división celular; una excepción es la zona del mesocótilo (*in vitro*) la cual presenta dos poblaciones.

4. Las células meristemáticas en las semillas de maíz están detenidas en las etapas de  $G_1$  y  $G_2$  del ciclo celular, etapas a partir de las cuales se reinicia la división.

5. La síntesis del ADN, considerada con base en la incorporación de la timidina tritiada en núcleos en interfase, se inicia entre las 14 y 20 h de incubación.

6. La auxina sintética MCPP no adelanta la mitosis en meristemas de maíz, sólo la afecta una vez que se presenta.

7. El MCPP estimula la mitosis, teniendo un efecto diferencial dependiendo del tejido ("blanco") y del momento (fases del ciclo celular) en que se encuentran las células.

8. El MCPP actúa preferencialmente sobre células provenientes de  $G_2$ .

9. El  $2^o$  MCPP produce un incremento de células en la etapa de profase.

## Referencias bibliográficas

1. Khan A.A. 1977. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. North Holland Publishing Company, New York.
2. Bewley J.D. y Black M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1. Springer-Verlag, New York.
3. Bewley J.D. y Black M. 1985. Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York.
4. Hess D. 1980. Fisiología vegetal. Fundamentos moleculares y bioquímico-fisiológicos del metabolismo y el desarrollo. Omega, Barcelona. p. 301-313.
5. Duffus C. y Slaughter C. 1980. Seeds and their uses. Wiley and Sons, New York. p. 73-74.
6. Schatt E., Landré P. y Nougarede A. 1985. État nucléaire des méristèmes du pois dans la graine sèche; imbibition et reprise du cycle cellulaire. Can. J. Bot. 63: 2200-2208.
7. Rodaway S., Huang B.F. y Marcus A. 1979. Nucleotide metabolism and the germination of seed embryonic axes. En: The plant seed: development, preservation and germination. Eds. Rubenstein I., Phillips R.L., Green Ch. E. y Gengenbach B.G. Academic Press, New York. p. 203-218.



8. Bryant J.A. 1976. Cap. 5 The cell cycle. En: Molecular aspects of gene expression in plants. Ed. Bryant J.A. Academic Press, Londres. p. 177-216.
9. Bayliss M.W. 1985. Regulation of the cell division cycle in cultured plant cells. En: The cell division cycle in plants. Eds. Bryant J.A. y Francis D. Cambridge University Press, Cambridge. p. 157-177.
10. Van't Hof J. 1985. Control points within the cell cycle. En: The cell division cycle in plants. Eds. Bryant J.A. y Francis D. Cambridge University Press, Cambridge. p. 1-13.
11. Giménez-Martín G., de la Torre C. y López-Sáez J.F. 1977. Cell division in higher plants. En: Mechanisms and control of cell division. Eds. Rost T.L. y Gifford E.M. Jr. Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. Stroudsburg, Pensilvania. p. 261-307.
12. Yamada Y. 1977. Cap. 11 Tissue culture studies on cereals. Narayanaswamy S. Cap. 1.10 Regeneration of plants from tissue cultures. En: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Eds. Reinert J. y Bajaj Y.P.S. Springer-Verlag, New York. p. 144-159 y 179-206.
13. Stoddart J.L. y Venis M.A. 1980. Cap. 5 Molecular and subcellular aspects of hormone action. En: Hormonal regulation of development I. Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 9. Ed. Mac Millan J. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 445-510.
14. Sánchez de Jiménez E. y Albores M. 1979. Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maíz (*Zea mays* L.). Agrociencia No. 37: 151-160.
15. Sánchez de Jiménez E., Albores M. y Loyola V.M. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. Ann. Appl. Biol. 98: 347-353.

16. Pérez L., Agullar R. y Sánchez de Jiménez E. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein anthesis and phosphorylation. *Physiol. Plant.* 69: 517-522.

17. Péaud-Lenoël C. 1977. The hormonal regulation of the cell division cycle. En: Plant growth regulation. Proc. of the 9<sup>th</sup> international conference on plant growth substances. Lausanne, 1976. p. 240-248.

18. Sandberg G., Ernstsén A. y Hamnede M. 1987. Dynamics of indole-3-acetic acid and indole-3-ethanol during development and germination of *Pinus sylvestris* seeds. *Physiol. Plant.* 71: 411-418.

19. Yasuda T., Yajima Y. y Yamada Y. 1974. Induction of DNA synthesis and callus formation from tuber tissue of *Jerusalem artichoke* by 2,4-D. *Plant Cell Physiol.* 15: 321-329.

20. Berlyn G.P. 1972. Seed germination and morphogenesis. En: Seed biology. Vol. 1 Importance, development and germination. Ed. Kozlowski T.T. Academic Press, New York. p. 223-312.

21. Sass J.E. 1955. Vegetative morphology. En: Corn and corn improvement. Ed. Sprague G.F. Academic Press, New York. p. 63-87.

22. Picklum W.E. 1953. Histological and cytological changes in the maize embryo during germination. Ph. D. Thesis. Iowa State University Library. Ames, Iowa.

23. Evenary M., Klein S., Anchori H. y Feinbrun N. 1957. The beginning of cell division and cell elongation in germinating lettuce seeds. *Bull. Res. Council. Isr., Sect. D.* 6: 33-37.

24. Haber A.H. y Luippold H.J. 1960. Separation of mechanisms initiating cell division and cell expansion in lettuce seed germination. *Plant Physiol.* 35: 168-173.

25. Ching T.M. 1972. Metabolism of germinating seeds. En: Seed biology. Vol. II Germination control, metabolism, and pathology. Ed. Kozlowski T.T. Academic Press, New York. p. 103-218.
26. Aguilar R. y Sánchez de Jiménez E. 1984. Amino acid pools and protein synthesis. Plant Cell Reports 3: 193-195.
27. Bray C.M. 1979. Cap. 7 Nucleic acid and protein synthesis in the embryo of germinating cereals. En: Ann. Proc. of the Phytochemical Society of Europe. Num. 16. Vol. 12 Recent Advances in the Biochemistry of Cereals. Eds. Laidman D.L. y Win Jines R.G. Academic Press, New York. p. 147-173.
28. Osborne D.J. 1982. Deoxyribonucleic acid integrity and repair in seed germination: the importance in viability and survival. En: The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. Ed. Khan A.A. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. p. 435-463.
29. Sen S., Payne P.I. y Osborne D.J. 1975. Early ribonucleic acid synthesis during germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis. Biochem. J. 148: 381-387.
30. Bhat S.P. y Padayatty J.D. 1975. Transcriptional events during early phase of germination of rice embryos. Nature (London) 256: 227-228.
31. Stoddard J.L., Thomas H. y Robertson A. 1973. Protein synthesis in barley embryos germinating seeds. Planta 112: 309-321.
32. Sánchez de Jiménez E., Aguilar R. y López S. 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. Biochem. Biophys. Res. Comm. 99: 445-450.

33. Spiegel S., Obendorf R.L. y Marcus A. 1975. Transcription of ribosomal and messenger-RNAs in early wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 56: 502-507.
34. Van Onckelen H.A., Verbeek R. y Khan A.A. 1974. Relationship of ribonucleic acid metabolism in embryo and aleurone to  $\alpha$ -amylase synthesis in barley. *Plant Physiol.* 53: 562-568.
35. Sen S. y Osborne D.J. 1977. Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (*Secale cereale* L.) embryos. *Biochem. J.* 166: 33-38.
36. Mory Y.Y., Chen D. y Sarid S. 1972. Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. *Plant Physiol.* 49: 20-23.
37. Yoshida K. y Sasaki K. 1977. Changes of template activity and proteins of chromatin during wheat germination. *Plant Physiol.* 59: 497-501.
38. Rogan P.G. y Simon E.W. 1975. Root growth and onset of mitosis in germinating *Vicia faba*. *New Phytologist* 74: 273-275.
39. Mayer A.M. y Poljakoff-Mayber A. 1963. The germination of seeds. Pergamon Press, Oxford. (Citado en Berlyn, 1972 (20)).
40. Haber A.H. 1968. Ionizing radiations as research tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19: 463-489.
41. Mitchison J.M. 1971. The biology of the cell cycle. Cambridge University Press, Londres. p. 58-158.
42. Howard A. y Pelc S.R. 1953. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity London Suppl.* 6, 261-273.

43. Baserga R. 1985. The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge. p. 3-33, 62-65, 81-100, 134-165.
44. Prescott D.M. 1976. Reproduction of eukaryotic cells. Academic Press, New York.
45. Pardee A.B., Campisi J. y Croy R.G. 1982. Differences in growth regulation of normal and tumor cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 397: 121-129.
46. Pardee A.B., Dubrow R., Hamlin J.L. y Kletzien R.F. 1978. Animal cell cycle. Ann. Rev. Biochem. 47: 715-750.
47. Wu R.S., Tsai S. y Bonner W.M. 1982. Patterns of histone variant synthesis can distinguish  $G_0$  from  $G_1$  cells. Cell 31: 367-374.
48. Darzynkiewicz Z., Sharpless T., Staiano-Coico L. y Melamed M.R. 1980. Subcompartments of the  $G_1$  phase of the cell cycle detected by flow cytometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6696-6699.
49. Chafouleas J.G., Lagace L., Bolton W.E., Boyd III A.E. y Means A.R. 1984. Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent ( $G_0$ ) cells into the cell cycle. Cell 36: 73-81.
50. Sans J., Giménez-Martín G. y de la Torre C. 1980. Onset of cell proliferation in dormant roots of *Allium cepa*. Kinetic analysis. Biol. Cell. 38: 95-104.
51. Pledger W.J., Howe P.H. y Leof E.B. 1982. The regulation of cell proliferation by serum growth factors. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 397: 1-10.
52. O'Farrell M. y Dixon C. 1986. Biosynthesis of nuclear proteins after stimulation of quiescent swiss mouse 3T3 cells. J. Cell Sci. 82: 173-186.

53. Mercer W.E., Avignolo C. y Baserga R. 1984. The role of the p53 protein in cell proliferation as studied by the microinjection of monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* 4: 276-281.
54. Chambard J.C., Franchi A., Le Cam A. y Pouyssegur J. 1983. Growth factor-stimulated protein phosphorylation in  $G_0/G_1$ -arrested fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258: 1706-1713.
55. Pardee A.B., Coopock D.L. y Yang H.C. 1986. Regulation of cell proliferation at the onset of DNA synthesis. *J. Cell Sci. Suppl.* 4: 171-180.
56. Epifanova O.I. y Polunovsky V.A. 1986. Cell cycle controls in higher eukaryotic cells: resting state or a prolonged  $G_1$  period? *J. theor. Biol.* 120: 467-477.
57. Cooper S. 1980. The continuum model: application to  $G_1$ -arrested and  $G_0$ . NATO Advanced Study Institute Series 38. Ed. Nicolini C. Plenum Press, New York. p. 315-336 (Citado en Wu et al, 1982 (47)).
58. Cosenza S.C., Owen T.A., Soprano D.R. y Soprano K.J. 1988. Evidence that the time of entry into S is determined by events occurring in early  $G_1$ . *J. Biol. Chem.* 263: 12751-12758.
59. Liskay R.M. y Prescott D.M. 1978. Genetic analysis of the  $G_1$  period: isolation of mutants (or variants) with a  $G_1$  period from a Chinese hamster cell line lacking  $G_1$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 2873-2877.
60. Newport J. y Kirschner M. 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterisation and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30: 675-686.

61. Stancel G.M., Prescott D.M. y Liskay R.M. 1981. Most of the G<sub>1</sub> period in hamster cells is eliminated by lengthening the S period. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6295-6298.

62. Liskay R.M., Kornfeld B., Fullerton P. y Evans R. 1980. Protein synthesis and the presence or absence of a measurable G<sub>1</sub> in cultured Chinese hamster cells. J. Cell Physiol. 104: 461-467.

63. Pardee A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1286-1290.

64. Pardee A.B. 1987. Molecules involved in proliferation of normal and cancer cells. Can. Res. 47: 1488-1491.

65. Moses H.L. y Robinson R.A. 1982. Growth factors, growth factor receptors, and cell cycle control mechanisms in chemically transformed cells. Fed. Proc. 41: 3008-3011.

66. Yang H.C. y Pardee A.B. 1986. Insulin-like growth factor I regulation of transcription and DNA replicating enzyme induction necessary for S phase entry. J. Cell Physiol. 127: 410-416.

67. Wu R.S. y Bonner W.M. 1981. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. Cell 27: 321-330.

68. Gurley L.R., Tobey R.A., Walters R.A., Hildebrand C.E., Hohman P.G., D'Anna J.A., Barham S.S. y Deaven L.L. 1978. Cap. 3 Histone phosphorylation and chromatin structure in synchronized mammalian cells. En: Cell cycle regulation. Eds. Jeter J.R., Cameron I.L., Padilla G.M. y Zimmerman A.M. Academic Press, New York. p. 37-60.

69. Moser G.C. y Meiss H.K. 1982. Nuclear fluorescence and chromatin condensation of mammalian cells during the cell cycle with special reference to the G<sub>1</sub> phase. En: Genetic expression in the cell cycle. Eds. Padilla G.M. y McCarty K.S. Academic Press, New York p. 129-147. (Citado en Baserga, 1985 (43)).
70. Bostock C.J. y Summer A.T. 1978. Cap. 6 The interphase nucleus. En: The eukaryotic chromosome. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. p. 175-231.
71. Waterborg J.H. y Shall S. 1985. The organization of replicons. En: The cell division cycle in plants. Ed. Bryant J.A. y Francis D. Cambridge University Press, Cambridge. p. 15-35.
72. Schwartzman J.B., Krimer D.B. y Van't Hof J. 1984. The effects of different thymidine concentrations on DNA replication in pea root cells synchronized by a protracted 5-fluorodeoxyuridine treatment. *Exp. Cell Res.* 150: 379-389.
73. Harland J., Jackson J.F. y Yeoman Y.Y. 1973. Changes in some enzymes involved in DNA biosynthesis following induction of division in cultured plant cells. *J. Cell Sci.* 13: 121-138.
74. Coppock D.L. y Pardee A.B. 1987. Control of thymidine kinase messenger-RNA during the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2925-2932.
75. Noguchi H., Reddy G.P.V. y Pardee A.B. 1983. Rapid incorporation of label from ribonucleoside diphosphates into DNA by a cell-free high molecular weight fraction from animal cell nuclei. *Cell* 32: 443-451.
76. Sherley J.L. y Kelly T.J. 1988. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 263: 8350-8358.



77. Reedy G.P.V. y Pardee A.B. 1980. Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3312-3316.

78. Coopock D.L. y Pardee A.B. 1985. Regulation of thymidine kinase activity in the cell cycle by a labile protein. J. Cell Physiol. 124: 269-274.

79. Sarabian E., Wu R.S., Erickson L.C. y Bonner W.C. 1985. Inter-relationships of protein and DNA synthesis during replication of mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 5: 1279-1286.

80. Stein G.S., Stein J.L., Baumbach L., Leza A., Lichtler A., Marashi F., Plumb M., Rickles P.R., Sierra F. y Van Dyke T. 1982. Organization and cell cycle regulation of human histone genes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 397: 148-167.

81. Plumb M., Stein J. y Stein G. 1983. Coordinate regulation of multiple histone mRNAs during the cell cycle in HeLa cells. Nucleic Acids Res. 11: 2391-2410.

82. Hirschhorn R.R., Marashi F., Baserga R., Stein J. y Stein G. 1984. Expression of histone genes in a G<sub>1</sub>-specific temperature-sensitive mutant of the cell cycle. Biochem. 23: 3731-3735.

83. Owen T.A., Cosenza S.C., Soprano D.R. y Soprano K.J. 1987. Time of c-fos and c-myc expression in human diploid fibroblasts stimulated to proliferative after prolonged periods in quiescence. J. Biol. Chem. 262: 5111-5117.

84. La Bella F., Zhong R. y Heintz N. 1988. Cell type-specific expression of a human histone H<sub>1</sub> gene. J. Biol. Chem. 263: 2115-2118.

85. Marks D.B., Paik W.K. y Borun T.W. 1973. The relationship of histone phosphorylation to DNA replication and mitosis during the HeLa S-3 cell cycle. J. Biol. Chem. 248: 5660-5667.

86. Yasuda H., Matsumoto Y., Mita S., Marunouchi T. y Yamada M. 1981. A mouse temperature-sensitive mutant defective in H<sub>1</sub> histone phosphorylation is defective in deoxyribonucleic acid synthesis and chromosome condensation. *Biochem.* 20: 4414-4419.

87. Gelfant S. 1975. Temperature-induced cell proliferation in mouse ear epidermis *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 90: 458-461.

88. Webster P.L. y Van't Hof J. 1970. DNA synthesis and mitosis in meristems: Requirements for RNA and protein synthesis. *Am. J. Bot.* 60: 889-895.

89. Van't Hof J., Hoppin D.P. y Yagi S. 1973. Cell rest in G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> of the mitotic cycle of *Vicia faba* root meristems. *Am. J. Bot.* 60: 889-895.

90. Laffler T.G., Chang M.T. y Dove W.F. 1981. Periodic synthesis of microtubular proteins in the cell cycle of *Physarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biol.* 78: 5000-5004.

91. Ares M. Jr. y Howell S.H. 1982. Cell cycle stage-specific accumulation of mRNAs encoding tubulin and other polypeptides in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5577-5581.

92. Rao P.N. y Aldakha R.C. 1985. Chromosome condensation and decondensation factors in the life cycle of eukaryotic cells. En: *Mediators in cell growth and differentiation*. Eds. Ford R.J. y Maizel A. Raven Press, New York. p. 45-69. (Citado en Baserga, 1985 (43)).

93. Osmani S.A., Engle D.B., Doonan J.H. y Morris N.R. 1988. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell* 52: 241-251.

94. Ferrero M.L. y de la Torre C. 1986. Cell proliferation in *Allium cepa* L. meristems under 8-hydroxyquinoline, a chelating agent that affects DNA and RNA polymerases. *J. Cell Sci.* 80: 171-180.
95. Navarrete M.H., Cuadrado A. y Cánovas J.L. 1983. Partial elimination of  $G_1$  and  $G_2$  periods in higher plant cells by increasing the S period. *Exp. Cell Res.* 148: 273-280.
96. Cuadrado A., Navarrete M.H. y Cánovas J.L. 1985. The effect of partial protein synthesis inhibition of cell proliferation in higher plants. *J. Cell Sci.* 76: 97-104.
97. Navarrete M.H., Cuadrado A., Escalera M. y Cánovas J.L. 1987. Regulation of  $G_2$  by cell size contributes to maintaining cell size variability within certain limits in higher plants. *J. Cell Sci.* 87: 635-641.
98. Kihlman B.A. y Anderson H.C. 1980.  $G_2$  repair and the formation of chromosomal aberrations, II. The effect of hydroxyurea and caffeine on streptonigrin and 8-ethoxycaffeine-induced chromosome damage in *Vicia faba*. *Environ. Exp. Bot.* 20: 271-286.
99. González-Fernández A., Hernández P. y López-Sáez J.F. 1985. Effect of caffeine and adenosine on  $G_2$  repair: mitotic delay and chromosome damage. *Mutat. Res.* 149: 275-281.
100. González-Fernández A. y López-Sáez J.F. 1982. Effect of caffeine on  $G_2$  repair and its reversion by adenosine. *Mutat. Res.* 106: 255-264.
101. Schlegel R. y Pardee A.B. 1987. Periodic mitotic events induced in the absence of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9025-9029.

102. Campisi J., Medrano E.E., Morreo G. y Pardee A.B. 1982. Restriction point control of cell growth by a labile protein: evidence for increased stability in transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 436-440.

103. Oren M., Maltzman W. y Levine A.J. 1981. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. Mol. Cell. Biol. 1: 101-110.

104. González-Fernández A., Giménez-Martín G., Fernández-Gómez M.E. y de la Torre C. 1974. Protein synthesis requirements at specific points in the interphase of meristematic cells. Exp. Cell Res. 88: 163-170.

105. García-Herdugo G., Fernández-Gómez M.E., Hidalgo G. y López-Sáez J.F. 1974. Effects of protein synthesis inhibition during plant mitosis. Exp. Cell Res. 89: 332-336.

106. Giménez-Martín G., González-Fernández A., Del Campo A. y de la Torre C. 1982. The role of protein synthesis in cell progression through G<sub>2</sub> and mitosis in plant multinucleate cells. Biol. Cell. 46: 161-174.

107. Moore T.C. 1979. Cap. 2 Auxins. En: Biochemistry and physiology plant hormones. Springer-Verlag, New York. p. 32-89.

108. Wareing P.F. y Phyllips I.D.J. 1981. Cap. 3 Plant growth hormones and their metabolism. En: Growth and differentiation in plants. 3ª Ed. Pergamon Press, Inglaterra. p. 51-73.

109. Jacobs W.P. 1979. Cap. 4 Other developmental effects of auxins. En: Plant hormones and plant development. Cambridge University Press, Cambridge. p. 73-102.

110. Weaver R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trillas, México. p. 483-544.

111. Schneider E.A. y Wightman F. 1978. Cap. 2 Auxins. En: *Phytohormones and related compounds - A comprehensive treatise*, Vol. 1. Eds. Letham, Goodwin y Higgins. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 29-105.

112. Cohen J.D. y Bandurski R.S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 403-430.

113. Plüss R., Jenny T. y Meier H. 1989. IAA-induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* and formation of 2-indole-3-acetylserine, a new metabolite of exogenously applied indole-3-acetic acid. *Physiol. Plant.* 75: 89-96.

114. Rivier I. y Pilet P.E. 1974. Indol-3-acetic acid in cap and apex of maize roots: identification and quantification by mass fragmentography. *Planta* 120: 107-112.

115. Saugy M. y Pilet P.E. 1984. Endogenous indol-3-yl-acetic acid in stele and cortex of gravistimulated maize roots. *Plant Sci. Lett.* 37: 93-99.

116. Greenwood M.S., Shaw S., Hillman J.R., Ritchie A. y Wilkins M.B. 1972. Identification of auxin from *Zea* coleoptile tips by mass-spectrometry. *Planta* 108: 179-183.

117. Iino M. y Carr D.J. 1982. Sources of free IAA in the mesocotyl of etiolated maize seedlings. *Plant Physiol.* 69: 1109-1112.

118. Cohen J.D. y Bandurski R.S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 403-430.

119. Zeroni M. y Hall M.A. 1980. Cap. 6 Molecular effects of hormone treatment on tissue. En: *Hormonal regulation of development I. Molecular aspects of plant hormones*. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 9. Ed. MacMillan J. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 511-586.

120. Jacobsen J.V. y Higgins T.J.V. 1978. Cap. 10 The influence of phytohormones on replication and transcription. Cap. 11 Post-transcriptional, translational and post-translational effect of plant hormones. En: Phytohormones and related compounds. Eds. Letham, Goodwin y Higgins. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 515-621.
121. Guilfoyle T.J. 1986. Auxin-regulated gene expression in higher plants. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 4: 247-276.
122. Silberger J. Jr. y Skoog F. 1953. Changes induced by indolacetic acid in nucleic acid contents and growth of tobacco pith tissue. Science 118: 443-444.
123. Theologis A. y Ray P. 1982. Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 418-421.
124. Hagen G. y Guilfoyle T.J. 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. Mol. Cell. Biol. 5: 1197-1201.
125. Sibley D.R., Benovic J.L., Caron M.G. y Lefkowitz R.J. 1987. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. Cell 48: 913-922.
126. Rubery P.H. 1981. Auxin receptors. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 569-596.
127. Lobler M. y Klambt D. 1985. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) I. Purification of immunological methods and characterization. J. Biol. Chem. 260: 9848-9853.
128. Sakai S. 1985. Auxin-binding protein in etiolated mung bean seedlings: purification and properties of auxin-binding protein II. Plant Cell Physiol. 26: 185-192.

129. Venis M.A. 1977. II Hormones-membranes. 4 Membrane-bound auxin receptors. Solubilization and characterization. En: Plant growth regulation. Proceedings of the 9th international conference on plant growth substances, Laussane. 1976. Ed. Pilet P.E. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 27-34.
130. Narayanan K.R., Mudge K.W. y Poovaiah B.W. 1981. *In vitro* auxin binding to cellular membranes of cucumber fruits. Plant Physiol. 67: 45-48.
131. Bogers R.J., Kulescha Z., Quint A., Van Vliet T.B. y Libbenga K.R. 1980. The presence of a soluble auxin receptor and the metabolism of 3-indolacetic acid in tobacco pith explants. Plant Sci. Lett. 19: 311-317.
132. Libbenga K.R. 1978. Hormone receptors in plants. En: Frontiers of plant tissue culture. p. 325-333.
133. Teissere M., Penon P. y Ricard J. 1973. Hormonal control of chromatin availability and of activity of purified RNA polymerases in higher plants. FEBS. Lett. 30: 65-70.
134. Guilfoyle T.J., Lin C.Y., Chen Y.M., Nagao R.T. y Key J.L. 1975. Enhancement of soybean RNA polymerase I by auxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 69-72.
135. Verma D.P.S., Maclachlan G.A., Byrne H. y Ewings D. 1975. Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. J. Biol. Chem. 250: 1019-1026.
136. Zurfluh L. y Guilfoyle T.J. 1982. Auxin and ethylene induced changes in the populations of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl. Plant Physiol. 69: 332-337.

137. Theologis A., Huynh T.V. y Davis R.W. 1985. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* 183: 53-68.

138. Zurfluh L. y Guilfoyle T.J. 1980. Auxin-induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357-361.

139. Key J.L., Kroner P., Walker J., Hong J.C., Ulrich T.H., Ainley W.M., Gantt J.S. y Nagao R.T. 1986. Auxin-regulated gene expression. En: *Differential gene expression and plant development*. Eds. Leaver C.J., Boulter F.R.S.D. y Flavell R.B. The Royal Society, Londres. p. 70-85.

140. Reedy A.S.N., Friedman M. y Poovaiah B.W. 1988. Auxin-induced changes in protein synthesis in the abscission zone of bean explants. *Plant Cell Physiol.* 29: 179-183.

141. Zurfluh L. y Guilfoyle T.J. 1982. Auxin-induced changes in the population of translatable RNAm in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156: 525-527.

142. Theologis A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.

143. Gantt J.S. y Key J.L. 1985. Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260: 6175-6181.

144. Libbenga K.R., Van Telgen H.J., Mennes A.M., Van der Linde P.C. y Van der Zaal E.J. 1986. Characterization and function analysis of a high-affinity cytoplasmic auxin-binding protein. En: *Molecular biology of plant growth control*. Eds. Fox J.E. y Jacobs M. UCLA Symposia on molecular and cellular biology. New Serie. Vol. 44. p. 486. New York Alan R. Liss Inc. N.Y., New York.



145. Pérez L. 1988. Auxinas. Modo de acción. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM, México.
146. Melanson D. y Trewavas A.J. 1982. Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. *Plant Cell Environ.* 5: 52-64.
147. Ainley W.M., Walker J.C., Nagao R.T. y Key J.L. 1988. Sequence and characterization of two auxin-regulated genes from soybean. *J. Biol. Chem.* 263: 10658-10666.
148. Yeoman M.M. y Mitchell J.P. 1970. Changes accompanying the addition of 2,4-D to excised Jerusalem artichoke tuber tissue. *Ann. Bot.* 34: 799-810.
149. Minocha S.C. 1979. Absciscic acid promotion of cell division and DNA synthesis in Jerusalem-artichoke *Helianthus tuberosus* tuber tissue cultured *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 327-340.
150. Bennici A., Cionini P.G., Gennai D. y Cionini G. 1982. Cell cycle in *Helianthus tuberosus* tuber tissue in relation to dormancy. *Protoplasma* 112: 133-137.
151. Van't Hof J. y MacMillan B. 1969. Cell population kinetics in callus tissue of cultured pea root segments. *Amer. J. Bot.* 56: 42-51.
152. Meyer Y. y Aspart L. 1983. The first mitotic cycle of mesophyll protoplasts. *Experientia Suppl.* 46: 93-100.
153. Cooke R. y Meyer Y. 1981. Hormonal control of tobacco protoplast nucleic acid metabolism during *in vitro* culture. *Planta* 152: 1-7.
154. Everett N.P., Wang T.L., Gould A.R. y Street H.E. 1981. Studies on the control of the cell-cycle in cultured plant-cells. 2. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D. *Protoplasma* 106: 15-22.

155. Gamburg K.Z. 1982. Regulation of cell division by auxin in isolated cultures. En: Plant growth substances 1982. Ed. Wareing P.F. Academic Press, Londres. p. 59-67.
156. Ettliger C. y Lehle L. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* 331: 176-178.
157. Nakajima H., Yokota T., Matsumoto T., Noguch M. y Takahashi N. 1979. Relationship between hormone content and autonomy in various autonomous tobacco *Nicotiana tabacum* cells cultured in suspension. *Plant Cell Physiol.* 20: 1489-1500.
158. Morris R.O., Akiyoshi D.E., MacDonald E.M.S., Morris J.W., Regier D.A. y Zaerr J.B. 1982. Cytokinin metabolism in relation to tumour induction. En: Plant growth substances 1982. Ed. Wareing P.F. Academic Press, Londres. p. 175-184.
159. Nishi A., Kate K., Takahasi M. y Yoshida R. 1977. Partial synchronization of carrot cell culture by auxin deprivation. *Physiol. Plant.* 39: 9-12.
160. Sánchez de Jiménez E. 1985. Comunicación personal. Departamento de Bioquímica Vegetal. Fac. de Química, UNAM.
161. Suzuki Y. y Minamikawa T. 1985. On the role of stored mRNA in protein synthesis in embryonic axes of germinating *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol.* 79: 327-331.
162. Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
163. Chen C.C. 1969. The somatic chromosomes of maize. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 752-754.

164. Sharma A.K. y Sharma A. 1980. Chromosomes techniques. Theory and practice. (3rd. Ed.). Butterworths, Londres. p. 107-109, 146.

165. Conger A.D. y Fairchild L.M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28: 281-283.

166. Giménez-Martín G. 1985. Comunicación personal. Instituto de Biología Celular, CSIC, España.

167. Gamborg O.L. y Wetter L.R. 1975. Plant tissue culture methods. Nat. Res. Council Can. Saskatoon, Saskatchewan. p. 96.

168. Zarain H.M., Bernal-Lugo I. y Vázquez Ramos J.M. 1987. Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. Mutat. Res. 181: 103-110.

169. Barlow P.W. y Macdonald P.D.M. 1973. An analysis of the mitotic cell cycle in the root meristem of *Zea mays*. Proc. R. Soc. Lond. B. 183: 385-398.

170. Verma R.S. y Lin M.S. 1978. Chemically induced alterations of the nuclear cycle and chromosomes in root meristem cells of maize. J. Heredity 69: 285-294.

171. Snedecor G.M. y Cochran W.G. 1981. Métodos estadísticos. Compañía Editorial Continental, México. p. 703.

172. Siegel S. 1986. Estadística no paramétrica. Trillas, México. p. 344.

173. Van de Walle C. y Bernier G. 1967. L'incorporation de la thymidine tritiée dans le cytoplasme précède incorporation dans le noyan cellulaire au cours de la germination de *Zea mays*. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 265: 1599-1601.

174. Stein O.L. y Quastler H. 1963. The use of tritiated thymidine in the study of tissue activation during germination in *Zea mays*. Amer. J. Bot. 50: 1006-1011.

175. Jakob K.M. y Bovey F. 1969. Early nucleic acid and protein synthesis and mitosis in the primary root tips of germinating *Vicia faba*. Exp. Cell Res. 54: 118-126.

176. Bryant T.R. 1969. DNA synthesis and cell division in germination onion. I. Onset of DNA synthesis and mitosis. Caryologia 22: 127-137.

177. Gonthier R., Jacquard A. y Bernier G. 1987. Changes in cell-cycle duration and growth fraction in the shoot meristem of *Sinapis* during floral transition. Planta 170: 55-59.

178. Bernier G., Kinet J.M. y Bronchart R. 1967. Cellular events at the meristem during floral induction in *Sinapis alba* L. Physiol. Vég. 5: 311-324.

179. Bishop R.C. y Klein R.M. 1971. Diurnal rhythms in mitosis of cells of the onion root tip meristem. Can. J. Genet. Cytol. 13: 597-599.

180. Pilet P.E. y Saugy M. 1986. Effect of applied and endogenous indol-3-y-l-acetic acid on maize root growth. Planta 164: 254-258.

181. Nissen P. 1985. Dose responses of auxins. Physiol. Plant. 65: 357-374.

182. Mulkey T.J., Kuzmanoff K.M. y Evans M.L. 1982. Promotion of growth and shift in the auxin dose/response relationship in maize roots treated with the ethylene biosynthesis inhibitors aminoethoxyvinylglycine and cobalt. Plant Sci. Lett. 25: 43-48.

183. Aguilar R. y Sánchez de Jiménez E. 1987. Datos no publicados.

184. Hayles J. y Nurse P. 1986. Cell cycle regulation in yeast. *J. Cell Sci. Suppl.* 4, 155-170.

185. Osmani S.A., Pu R.T. y Morris N.R. 1988. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a  $G_2$ -specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 53: 237-244.

186. de la Torre C., González-Fernández A. y Giménez-Martín G. 1971. Cell flow and its application to the estimate of cell cycle parameters in meristems. *Biol. Zbl.* 90: 707-710.

187. Wernicke W. y Milkowitz L. 1987. Effect of auxin on the mitotic cell cycle in cultured leaf segments at different stages of development in wheat. *Physiol. Plant.* 69: 16-22.

188. Evans L.S. y Van't Hof J. 1974. Is the nuclear DNA content of mature root cells prescribed in the root meristem? *Amer. J. Bot.* 61: 1104-1111.

189. Everett N.P., Wang T.L., Gould A.R. y Street H.E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. II Effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. *Protoplasma* 106: 15-22.

190. Wernicke W. y Milkowitz L. 1987. Rates of uptake and metabolism of indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by cultured leaf segments at different stages of development in wheat. *Physiol. Plant.* 69: 23-28.

191. Gonthier R., Jacquard A. y Bernier G. 1985. Occurrence of two cell subpopulations with different cell-cycle durations in the central and peripheral zones of the vegetative shoot apex of *Sinapis alba* L. *Pianta* 165: 288-291.

192. Walker D.B. y Bruck D.K. 1985. The control of positional cell differentiation in plants. *Current Communications in Molecular Biology*. En: *Plant cell/cell interactions*. Eds. Sussex I., Ellingboe A., Crouch M. y Malmberg R. Cold Spring Harbor Lab. USA. p. 53-56.

193. McDaniel C.N. y Poethig R.S. 1988. Cell-leneage patterns in the shoot apical meristem of the germinating maize embryo. *Planta* 175: 13-22.

194. Vázquez Ramos J.M. y López S. 1986. Inhibición *in vitro* de la síntesis de ADN durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-CTP. *Rev. Sco. Quim. Mex.* 30: 119-123.

195. Schwartzman J.B. y Díez J.L. 1977. Late replicating DNA and the cell cycle of *Allium cepa*. *Cytobiologie* 14: 310-318.

196. Navarrete M.H., Pérez-Villamil B. y López-Sáez J.F. 1979. Analysis of the interphase accumulation induced by hydroxyurea on proliferating plant cells. *Exp. Cell Res.* 124: 151-157.