
ACCION DEL ACIDO INDOLEACETICO Y DEL MONOFOSFATO-1 DE GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE LA RAIZ DE MAIZ

GABRIEL BALDOVINOS
Laboratorios de Fisiología Vegetal y
Bioquímica. Instituto de
Investigaciones Agrícolas, México, D.
F.

Parte del trabajo de investigación de Tesis Doctoral
realizado en los Laboratorios de Fisiología Vegetal
de Iowa State College, U. S. A. El autor agradece
la dirección del Dr. W. E. Loomis.

El examen de las estructuras químicas de tejidos *in vivo* y la descripción de sus relaciones con cambios en actividad meristemática podrían revelar la naturaleza de los mecanismos de división y alargamiento celulares operando en tejidos en pleno crecimiento. El estudio de los efectos de los cambios químicos inducidos sobre las zonas de crecimiento a medida que éstas se van desarrollando bajo condiciones controladas podrían proporcionar igualmente informaciones muy valiosas sobre la naturaleza del crecimiento.

Baldovinos (1) encontró que el crecimiento del ápice meristemático de la raíz de maíz se limita a los 4 primeros milímetros abajo de la poloriza y que dicha porción radicular posee 3 zonas de crecimiento claramente definidas, localizadas específicamente sobre distintos puntos del ápice radicular. El crecimiento que tiene lugar en el primer milímetro es a base de formación de nuevas células por división mitótica a velocidades moderadas y con alargamientos de las células hijas hasta alcanzar el tamaño de las células madres, pero no más allá. El crecimiento en el segundo milímetro incluye una zona de división y alargamiento acelerados, concentrándose la formación de nuevas células en los primeros cinco décimos de milímetro y los procesos de alargamiento en los cinco décimos basales. El crecimiento en el tercer y cuarto milímetro es por alargamiento de las células exclusivamente, iniciándose a partir de los milímetros quinto y sexto los procesos de diferenciación.

MATERIALES Y METODOS

Segmentos representativos de las tres zonas de crecimiento del ápice meristemático de la raíz de maíz fueron cultivados en solución nutritiva bajo condiciones de esterilidad siguiendo la técnica de Robbins (6). Lotes de semillas de maíz seleccionado por uniformidad fueron desinfectados con Arasán y puestos a germinar entre dos hojas de papel secante húmedo colocadas en cajas de Petri de 18 cm. de diámetro X 8 cm. de altura, de tal manera que los procesos de germinación se desarrollaron bajo un mínimo de contaminación microbiológica. Las cajas de Petri fueron colocadas en un incubador ajustado a una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. con una humedad relativa de 85%. De cada lote fueron escogidos los brotes con diámetros radiculares uniformemente desarrollados. Los brotes fueron desinfectados sumergiéndolos por unos instantes en una solución de hipoclorito de calcio al 1% recientemente preparada y filtrada, lavándolos inmediatamente varias veces con agua de la llave. Las plántulas fueron distribuidas al azar en grupos de diez en cajas de Petri esterilizadas conteniendo 3 ml de agua doblemente destilada con 1 ó 2 gotas de solución de hipoclorito de calcio al 1%.

De cada radícula fueron separadas las 3 zonas de crecimiento utilizando un instrumento cortador especialmente diseñado de 4 X 2.5 X 2.5 cm. que tuvo 4 hojas de rasurar montadas en un soporte separadas por una placa de 4 X 1.5 cm. y atornilladas entre sí. El espesor de cada una de estas placas fue de $1.9 \pm 0.01 \text{ mm}$. y el espesor de cada hoja de rasurar de $0.1 \pm 0.02 \text{ mm}$. haciendo en total la distancia entre 2 hojas adyacentes de 2 mm. El instrumento fue esterilizado sumergiéndolo en alcohol de 95% y quemado el exceso de alcohol. Cada radícula se cortó en 3 segmentos de 2 mm. utilizando el instrumento cortador con la ayuda de binoculares estereoscópicos, siendo necesario ejercer una presión muy ligera sobre la radícula para separar las 3 zonas de crecimiento. Las operaciones de corte se efectuaron en un cuarto frío con temperatura alrededor de 5°C .

Los segmentos fueron transferidos individualmente según zonas a los medios de cultivo respectivos utilizando

un gancho de alambre de cromo el gancho fue esterilizado en la flama y dejado enfriar antes de tocar los segmentos de raíz. Todo el trabajo ejecutado en las operaciones de transferencia de los segmentos fue realizado en una cámara de siembra esterilizada con fenol, evitándose las contaminaciones microbiológicas.

Los segmentos fueron suspendidos en matraces Erlenmeyer de 30 c.c. conteniendo 3 c.c. de solución nutritiva. Los matraces fueron montados en un agitador de acción de muñeca operando a 100 golpes por minuto, obteniéndose de esta manera una buena aereación. Los matraces conteniendo los segmentos fueron puestos en una incubadora ajustada a una temperatura de $30 \pm 2.0^\circ \text{C}$. La solución nutritiva se hizo combinando las fórmulas de White (7) y Bonner (2) llevando la siguiente composición:

	mg.	Nº del registro químico
Ca(NO ₃) ₂	100.0	Bakers — 41
KNO ₃	80.0	Bakers — 26
MgSO ₄ • 7H ₂ O	35.0	Merck — 18327
KCL	65.0	Merck — 42994
KH ₂ PO ₄	12.5	Bakers — 63
H ₃ BO ₃	1.5	Bakers — D327
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	1.5	Bakers — D279
MnSO ₄ • 4H ₂ O	4.5	Bakers — 27
Hidrocloruro de tiamina	0.1	General Biochem.
Glicina	2.0	Inc. — 18079
Piridoxina	0.1	Pfanstiehl — 583
Acido nicotínico	0.5	Merck — 52871
Tartrato de fierro	1.5	Sargent
Agua destilada hasta completar	1,000 ml	
Sacarosa q.p. al 2 % por peso		

La solución nutritiva fue esterilizada durante 15 minutos en un autoclave horizontal a 15 lbs. de presión.

Al terminar los experimentos se tomaron como medidas del crecimiento los aumentos en peso de materia seca y los incrementos en longitud, a menos que se especifiquen otros medios.

ACCION DEL ACIDO INDOLEACETICO

En virtud del reciente interés que ha despertado la acción de las auxinas sobre el crecimiento, fueron investigados los efectos de distintas concentraciones de auxinas sobre el desarrollo *in vitro* de segmentos de 2 mm. representativos de las zonas de división, alargamiento y diferenciación suspendidos en solución nutritiva aereada. Los datos sobre la magnitud del crecimiento y la composición química estimados al final de 24 horas se muestran en las Tablas 1 y 2.

El ácido indoleacético estuvo relacionado con las alteraciones en el desarrollo de los segmentos meristemáticos por lo menos en 3 formas: En la zona de división celular, (1° y 2° mm) la concentración de 1×10^{-6} M indujo una acción retardada sobre los aumentos en peso fresco, seco y en longitud, mientras que los procesos metabólicos de la zona de alargamiento (3° y 4° mm.) fueron bloqueados con la muerte de las células, y pérdidas en pesos fresco y seco.

TABLA NÚM. 1.

EFFECTOS DEL ACIDO IDOLEACETICO (I.A.A.) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICION QUIMICA DE LOS 2 PRIMEROS MILIMETROS DEL APICE MERISTEMATICO DE RAICES PRIMARIAS DE MAIZ, SUSPENDIDAS EN SOLUCION NUTRITIVA A 30° C

I.A.A M/1	Long. en mm.	Diámetro mm.	Peso fresco gamma	Peso seco gamma	% sobre el peso seco	Azúcares totales. % del peso fresco	Nitrógeno soluble. % del peso fresco	Materiales insolubles en alcohol. Gamma
<i>Al comienzo del experimento</i>								
<i>Testigo</i>	2.0	0.8	1800	310	17.2	.78	0.25	257
<i>Al final de 24 horas</i>								
<i>Testigo</i>	7.7	1.0	4300	610	14.2	5.80	0.96	260
1×10^{-6}	4.5	0.8	2800	374	13.5	5.60	1.12	—
1×10^{-7}	9.5	1.2	3400	420	12.3	3.18	0.52	—
1×10^{-8}	11.3	0.6	6350	620	9.8	2.57	0.49	394
1×10^{-9}	15.4	0.7	8275	760	9.2	1.54	0.33	540

TABLA NÚM. 2.

EFFECTOS DEL ACIDO IDOLEACETICO (I.A.A.) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICION QUIMICA DE LA ZONA DE ALARGAMIENTO (mm 3 Y 4) DE RAICES PRIMARIAS DE MAIZ, SUSPENDIDAS EN SOLUCION NUTRITIVA A 30° C

I.A.A M/1	Long. en mm.	Diámetro mm.	Peso fresco gamma	Peso seco gamma	% sobre el peso seco	Azúcares totales. % del peso fresco	Nitrógeno soluble. % del peso fresco	Materiales insolubles en alcohol. Gamma
<i>Al comienzo del experimento</i>								
<i>Testigo</i>	2.0	1.2	2540	260	10.2	1.10	0.35	165
<i>Al final de 24 horas</i>								
<i>Testigo</i>	2.0	1.4	2640	300	11.3	3.80	2.40	171
1×10^{-9}	2.8	0.8	1870	130	6.9	0.17	0.15	—
1×10^{-8}	3.8	1.6	3120	360	11.5	2.20	0.60	—
1×10^{-7}	6.3	1.5	5900	480	8.2	1.60	0.47	337
1×10^{-6}	7.6	1.3	3940	300	7.6	1.40	0.20	230

Los segmentos suspendidos en concentraciones de 1×10^{-7} M y 1×10^{-8} M mostraron algunas anomalías meristemáticas tales como ramificaciones, doblamientos y formaciones callosas. Finalmente, en los segmentos tratados con una concentración de 1×10^{-9} M se observó una activación relativamente grande del crecimiento expresada por los incrementos en longitud y peso fresco. Los segmentos tratados con dicha concentración se vacuolaron rápidamente y tuvieron diámetros radiculares pequeños.

Burström (3) encontró en segmentos de raíz de trigo, retardación y activación bajo la misma concentración de auxina cuando se aplicó en diferentes intervalos de tiempo y en diferentes etapas del desarrollo meristemático. Los resultados de Chao y Loomis (4) indicando que las síntesis de proteínas y de auxinas tienen lugar en la célula meristemática simultáneamente, podría tomarse como una indicación de que en nuestros experimentos las hormonas por sí mismas no fueron capaces de desarrollar una activación del crecimiento relativamente notable sin venir acompañada de síntesis de protoplasma. Puesto que se encontró que en los 2 primeros milímetros del ápice de la raíz ocurre el mayor número de las reacciones de condensación de proteínas, se podría sugerir una gran activación del crecimiento debido a la presencia de auxinas. Por otro lado, en los 2 primeros milímetros se encontró que los efectos de la auxina sobre el crecimiento fueron notables con respecto a los milímetros 3 y 4, donde no ocurre formación de núcleos, obteniéndose de esa manera un apoyo para la inferencia antes mencionada.

Los azúcares totales se acumularon en las secciones tratadas con concentraciones de 1×10^{-7} M y 1×10^{-8} M encontrándose que los porcentajes de los pesos frescos fueron 2 y 3 veces más grandes que aquéllos

correspondientes a segmentos radicales intactos. Las zonas de división y alargamiento tratadas con una concentración de 1×10^{-9} M mostraron contenidos de azúcares más aproximados a los contenidos normales. En la zona de división, la acumulación relativa de materiales insolubles en alcohol aumentó 2 veces mientras que en la zona de alargamiento aumentó 1/3.

EFFECTOS DEL MONOFOSFATO DE GLUCOSA

En la solución nutritiva básica la sacarosa fue substituida por glucosa y por monofosfato de glucosa (glucosa-1- PO_4). Los segmentos meristemáticos de 2 mm fueron suspendidos en 3 ml de solución nutritiva aerada incluyendo 1×10^{-9} M de ácido indoleacético. El pH de la solución se ajustó con buffer de citrato entre los límites 4.0 y 6.5 a intervalos de 0.5. Los matraces fueron incubados a 30°C . Las diferencias en el crecimiento fueron observadas al final de 18 horas y se muestran en la Tabla N° 3.

TABLA NÚM. 3.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO SOBRE EL DESARROLLO DE LAS ZONAS DE DIVISION (mm 1 Y 2) Y ALARGAMIENTO (mm 3 Y 4) DE RAICES PRIMARIAS DE MAIZ SUSPENDIDAS EN SOLUCION NUTRITIVA AJUSTADA A DIFERENTES pH. Y A 30°C . LONGITUDES DE SEGMENTOS DE 2 MM. AL FINAL DE 18 HORAS.

Substrato	Región	pH					
		4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
2% glucosa	División	2.7	3.0	4.5	6.5	6.8	7.0
	Alargamiento	2.5	3.0	4.0	5.8	6.0	6.3
2% glucosa-1- PO_4	División	2.0	2.0	7.0	2.2	2.0	2.0
	Alargamiento	2.0	2.2	5.0	2.2	2.0	2.0
2% Sacarosa	División	3.5	4.0	7.0	7.9	8.3	8.5
	Alargamiento	3.0	4.0	6.0	7.0	7.0	7.2

Los incrementos en longitud de los segmentos relativamente mayores tuvieron lugar en los cultivos con sacarosa, seguidos consistentemente por los incrementos en longitud de los segmentos cultivados en glucosa como fuente de carbono. Ningún crecimiento ocurrió entre los cultivos conteniendo monofosfato de glucosa excepto a pH de 5.0. La aparente incapacidad de los sistemas meristemáticos de la raíz de maíz para utilizar el monofosfato de glucosa a pH distintos que 5.0 podría considerarse como debida al bloqueo, de los sistemas enzimáticos del tipo de las fosfatasa. Se ha indicado que estas enzimas operan bajo concentraciones de iones hidrógeno muy precisas. Alrededor del pH de 5.0 los sistemas enzimáticos de las fosfatasa mono-hexósicas operando en raíces de maíz probablemente tuvieron niveles de actividad mínima, permitiéndole al monofosfato de glucosa difundirse hacia las células meristemáticas bajo un gradiente de concentraciones exclusivamente. Una vez dentro del protoplasma, este compuesto probablemente fue incorporado al ciclo clásico de desdoblamiento respiratorio de los carbohidratos. A un pH de 5.0 los segmentos suspendidos en monofosfato de glucosa mostraron un desarrollo tan bueno como el de aquellos suspendidos en sacarosa y aun mejor que aquellos suspendidos en glucosa.

Los estudios que realizaron Dörner y Street (5) sobre los cambios en la distribución de los carbohidratos como resultado del crecimiento *in vitro* de segmentos de raíz de jitomate suspendidos en sacarosa, indicaron el funcionamiento de un mecanismo encargado de romper la molécula de sacarosa en sus dos componentes, coincidente con la absorción de una molécula de glucosa por cada 2 moléculas de sacarosa degradadas. Fue esbozada igualmente, la posibilidad de que la absorción de azúcar *in vitro* por las células de la epidermis se efectúa mediante una fosforilación sobre la superficie externa de la membrana del citoplasma con la liberación del azúcar dentro del citoplasma y se sugirió que los azúcares difunden a través de la membrana citoplásmica activados en la forma de fosfatos de hexosa.

REFERENCIAS

1. BALDOVINOS, G. P. The growth of corn roots. Tesis de Master of Science no Publicada. Iowa State College Libraly. Ames, Iowa, 1947.
2. BONNER, J. On the growth factor requirement of isolated roots. Am. Jour. of Bot. 27: 692-701, 1940.
3. BURSTRÖM, H. The influence of heteroauxin on cell growth and root development. Uppsala Ann. Agric. Coll. Sweden. 10: 209-240, 1942.
4. CHAO, M. D., and LOOMIS, W. E. Temperature coefficients of cell enlargement. Bot. Gaz. 109: 225-231, 1947.
5. DORNER, M. J., and STREET, H. E. The carbohydrate nutrition of tomato roots. Annals of Bot. New Ser. 13: 199-217, 1949.
6. ROBBINS, W. J., and SCHMIDT, M. B. Growth for excised roots of the tomato. Bot. Gaz. 99: 671-728, 1937.
7. WHITE, P. R. Accessory salts in the nutrition excised roots. Plant Phys. 13: 391 - 398, 1938.

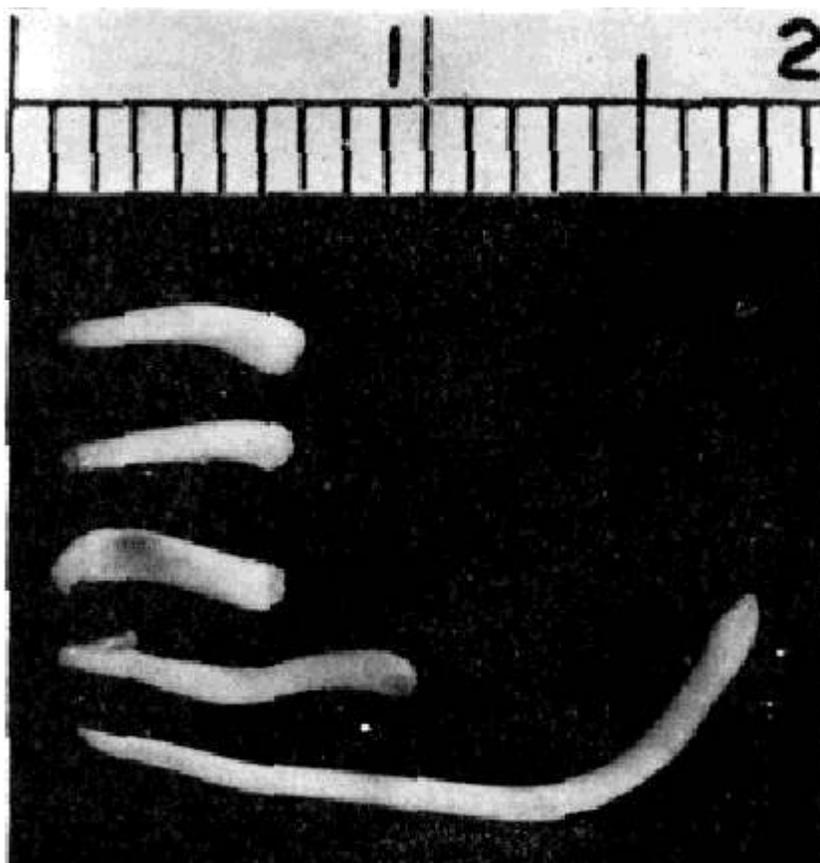


Fig. 1. Crecimiento *in vitro* de la zona de división (1° y 2° mm.) del ápice meristemático de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de ácido indolacético. De arriba para abajo: longitud en mm. al final de las 24 horas del testigo, 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , y 1×10^{-9} M de ácido indolacético.

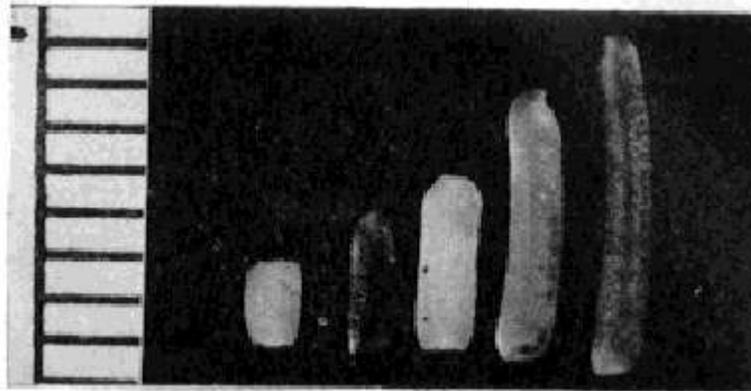


Fig. 2. Crecimiento *in vitro* de la zona de alargamiento (3° y 4° mm.) del ápice meristemático de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de ácido indolacético. De arriba para abajo: longitud en mm. al final de las 24 horas del testigo, 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , y 1×10^{-9} M de ácido indolacético.

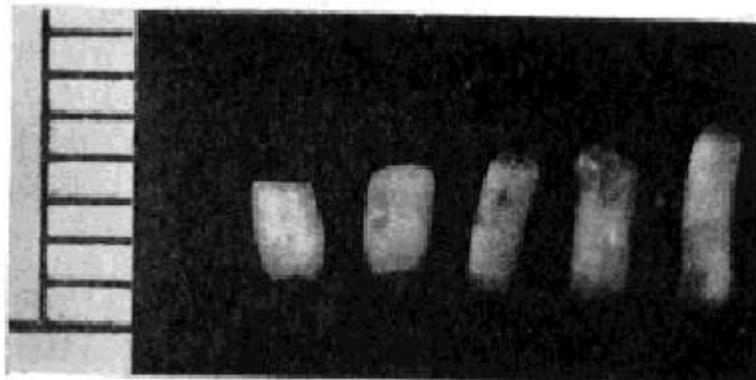


Fig. 3. Crecimiento *in vitro* de la zona de diferenciación (5° y 6° mm.) del ápice meristemático de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de ácido indolacético. De arriba para abajo: longitud en mm. al final de las 24 horas del testigo, 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , y 1×10^{-9} M de ácido indolacético.

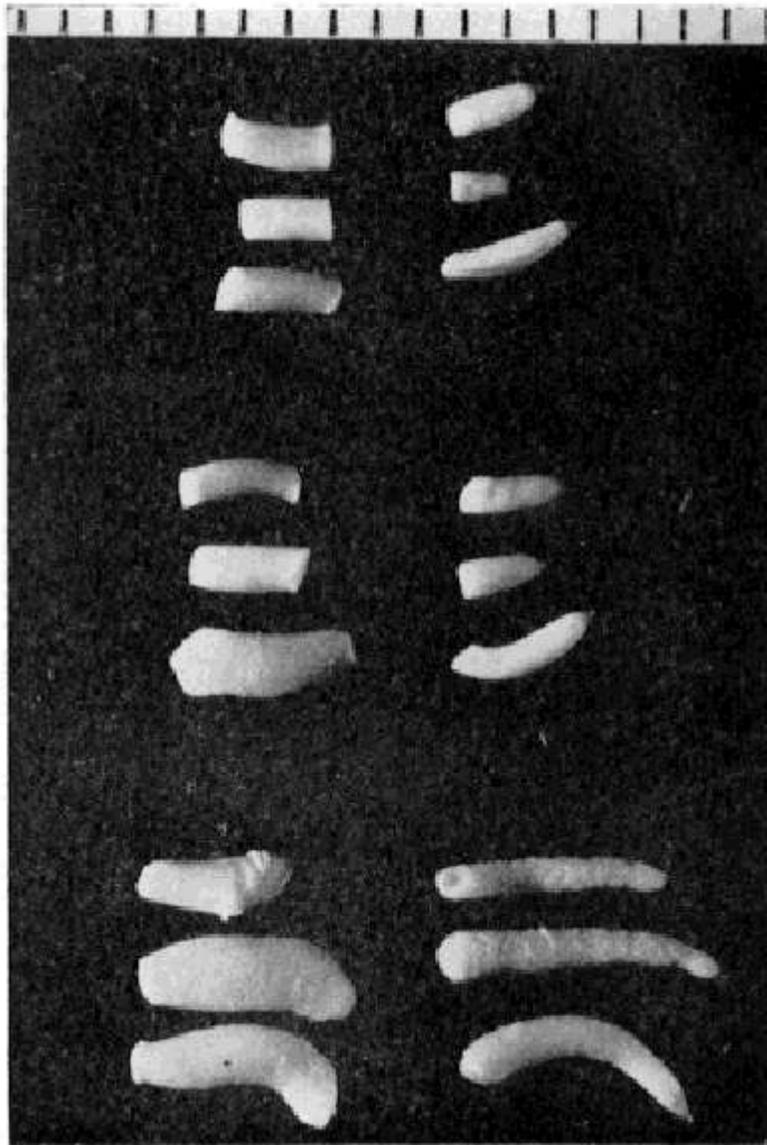


Fig. 4. Crecimiento *in vitro* de las zonas de división (columna derecha) y alargamiento (columna izquierda) de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva ajustadas a 3 distintos pH y en 3 fuentes de carbono. De arriba para abajo (por grupos de 3), pH 4.0, 4.5 y 5.0; dentro de cada grupo de arriba para abajo: glucosa al 2% monofosfato-1 de glucosa al 2% y sacarosa al 2%.

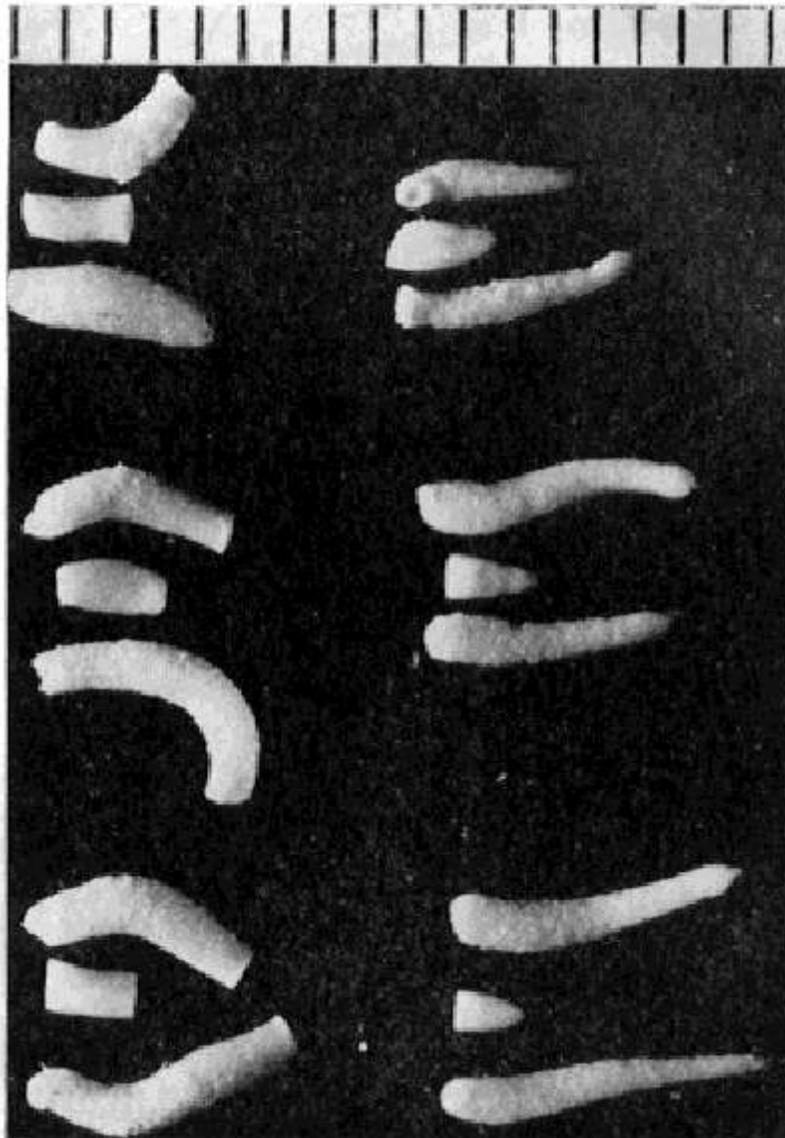


Fig. 5. Crecimiento *in vitro* de las zonas de división (columna derecha) y alargamiento (columna izquierda) de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva ajustadas a 3 distintos pH y en 3 fuentes de carbono. De arriba para abajo (por grupos de 3), pH 5.5, 6.0 y 6.5; dentro de cada grupo de arriba para abajo: glucosa al 2% monofosfato-1 de glucosa al 2% y sacarosa al 2%.

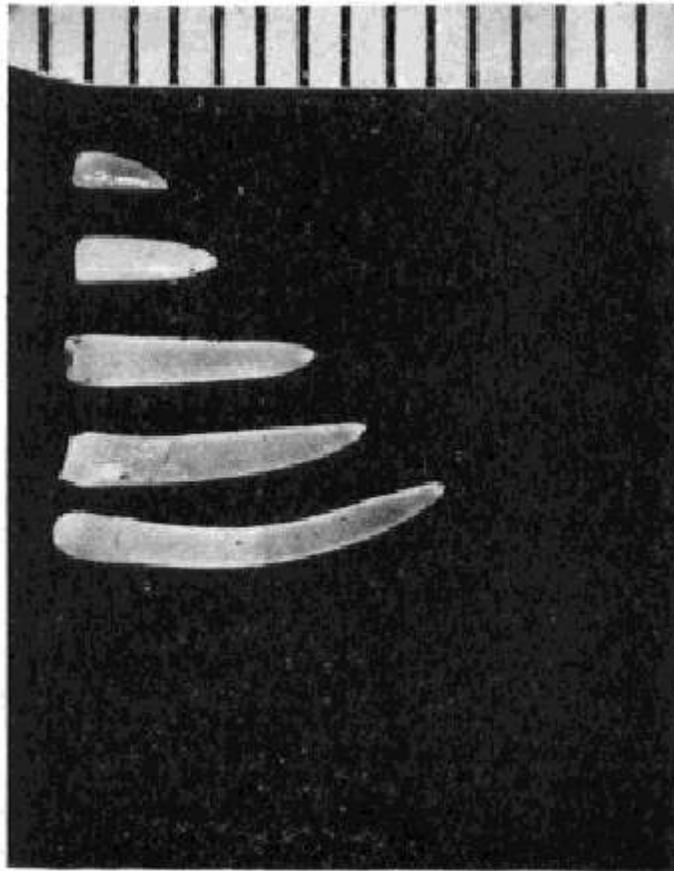


Fig. 6. Crecimiento *in vitro* de la zona de división (1° y 2° mm.) de raíces primarias de maíz suspendidas en solución nutritiva ajustada al pH de 5.0, conteniendo distintas fuentes de carbono. De arriba para abajo, longitud en mm. al final de 18 horas del testigo, glucosa, monofosfato-1 de glucosa y sacarosa. Hasta abajo, un segmento cultivado en sacarosa y al pH (óptimo) de 6.5