

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE HIPOCOTILOS ETIOLADOS DE ALTRAMUZ: ALARGAMIENTO DEL ÓRGANO Y VARIACIÓN DE TAMAÑO CELULAR

A. Ortuño*, J. Sánchez Bravo*, M. Acosta* y F. Sabater*

Recibido: septiembre 1984

ABSTRACT

Study of growth in etiolated hypocotyls of lupine: elongation of the organ and variation of the cellular size

The growth of the etiolated hypocotyls of lupine has been studied. The distribution of both the relative growth and the cellular parameters shows that the length of the cell parallels with the elongation of the organ, and varies along this.

RESUMEN

Se estudia la distribución y variación con la edad del crecimiento de hipocotilos etiolados de altramuz (*Lupinus albus*), determinando la velocidad de alargamiento del órgano y el valor de diferentes parámetros celulares. El tamaño celular evoluciona de forma paralela al alargamiento del hipocotilo y vana a lo largo del mismo.

INTRODUCCIÓN

Conocido el efecto del AIA (ácido indolil-3-acético), como regulador de numerosos procesos del crecimiento, tanto a nivel celular (CLELAND, 1976; RAYLE *et al.*, 1977; RAY, 1973; ALONI *et al.*, 1983), como a nivel de órganos (THIMANN, 1937), y dada la amplitud de la investigación llevada a cabo sobre niveles hormonales endógenos (ORTUÑO, 1979) y metabolismo auxínico (CABALLERO, 1982; MONTALBÁN, 1981) en hipocotilos etiolados de altramuz, resulta evidente la necesidad de realizar un estudio amplio sobre el crecimiento de este órgano a fin de poder establecer las oportunas correlaciones con el crecimiento. Ello es imprescindible para poder llegar a establecer el papel de la auxina y sus metabolitos en el crecimiento de este órgano.

El objetivo del presente trabajo consiste en determinar la distribución del crecimiento del hipocotilo de altramuz y su variación con la edad. Para ello se realiza un estudio comparado

entre el crecimiento del órgano y los valores de diferentes parámetros celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO Y CRITERIOS DE SELECCION

Semillas de altramuz (*Lupinus albus*) seleccionadas por peso (0.9-1.0 g) se embeben en agua durante 24 h en oscuridad y se siembran en bandejas de plástico sobre vermiculita. La plantación se mantiene en cámara de cultivo a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y oscuridad, efectuando riegos periódicos con agua sin superar la capacidad de campo.

A los 7 días se lleva a cabo una selección general por tamaño (3.5-4 cm. altura media del conjunto de la población) de todas las plantas utilizadas en los diferentes ensayos, procediendo al marcado de zonas para el estudio del crecimiento. A cada edad, las plántulas utilizadas para la determinación del crecimiento de la población son seleccionadas entre aquellas que presentan una historia previa de crecimiento semejante. Los datos mostraron que todas las plantas seleccionadas cumplían este requisito.

* Departamento interfacultativo de Biología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HIPOCOTILO

El alargamiento del hipocotilo se determina por el clásico procedimiento del desplazamiento de marcas de tinta. En el marcado inicial (a los 7 días de edad), se delimitan 7 zonas de 0'5 cm de longitud que se denominan A, B, C, D, E, F y G. Como se muestra en la figura 1, la zona A está situada inmediatamente por debajo de los cotiledones y contiene la zona meristemática del órgano; la zona G queda inmediatamente por encima de la raíz, situándose las restantes zonas entre ambas.

Las medidas de crecimiento se realizan a intervalos de dos días, y los resultados se expresan como crecimiento relativo, calculado de acuerdo con la expresión:

$$\text{crecimiento (\%)} = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \times 100 .$$

donde L_0 y L_1 corresponden respectivamente a la longitud inicial y final de cada zona en el intervalo de crecimiento.

ESTUDIO MICROSCÓPICO

A distintas edades se efectúan cortes transversales y longitudinales de zonas marcadas en el hipocotilo.

Los cortes se realizan con microtono de mano, y las preparaciones se montan en bálsamo de Canadá, previa tinción con hematoxilina-verde iodo. Mediante micrómetro ocular se determinan en cada caso diversos parámetros celulares: a) espesor de tejidos (corteza, cilindro vascular y médula), en cortes transversales, y b) dimensiones celulares de los distintos tejidos (epidermis, parénquima de corteza y médula), determinando en cortes transversales los diámetros y en longitudinales la longitud de la célula.

Simultáneamente, en la preparación se observa la existencia de material lignificado que se tiñe de verde por acción del verde iodo, así como la presencia o no de xilema secundario en alguna zona o etapa de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) ESTUDIO A NIVEL DE ÓRGANO

Crecimiento de la plántula. Durante la primera etapa del desarrollo de la plántula de altramuz, el hipocotilo es el órgano aéreo que crece más rápidamente. Este órgano se localiza entre la raíz y los cotiledones. El epicotilo o porción del tallo situada por encima de los cotiledones, y que es portador de las hojas, no empieza a crecer apreciablemente hasta una etapa posterior, cuyo inicio viene a coincidir con el descenso del crecimiento del hipocotilo (fig. 1).

Representando el incremento de longitud que

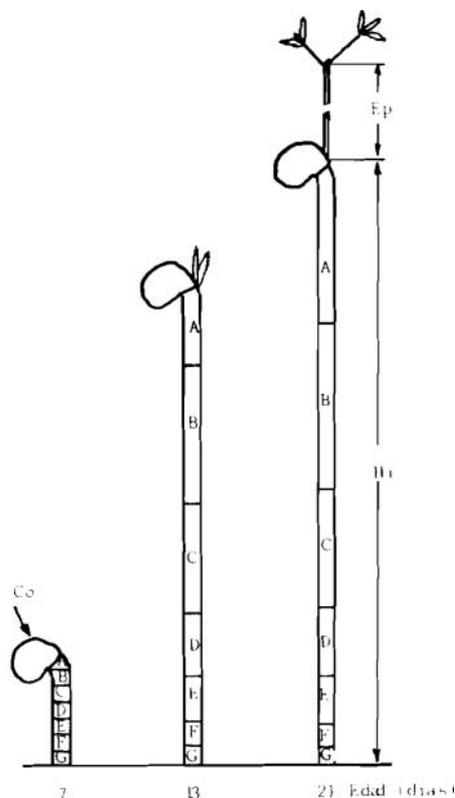


FIGURA 1. Estados de desarrollo de la plántula de altramuz a diferentes edades (Ep=epicotilo; Hi=hipocotilo; Co=cotiledón). Distribución de marcas que delimitan las distintas zonas para el estudio del crecimiento.

Development of lupine seedling (Ep=epicotyl; Hi=hypocotyl; Co=cotyledon) The marks delimit the zones for the study of growth

experimenta el hipocotilo a diferentes edades, a fin de determinar la cinética del crecimiento de este órgano (fig. 2), se aprecia que el crecimiento alcanza su valor máximo hacia los 11 días de edad, descendiendo posteriormente hasta anularse definitivamente hacia los 20 días de edad. A partir de este momento se aprecia un crecimiento rápido del epicotilo que va acompañado de formación y desarrollo de las hojas. Estos resultados sugieren que el hipocotilo es un órgano de crecimiento determinado ya que su alargamiento cesa una vez alcanzado un cierto tamaño, que en las diferentes plantaciones oscila entre 18 y 20 cm.

Distribución del crecimiento. Localización de la zona de elongación. El crecimiento relativo de las distintas zonas que se señalan en el hipocotilo cambia con la edad.

En la figura 3 se representa gráficamente el

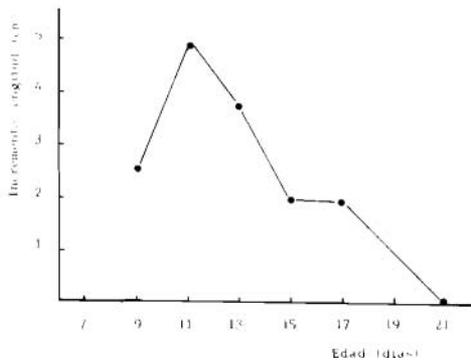


FIGURA 2. Incremento de longitud que experimenta el hipocotilo en los dos días anteriores a cada edad.

Increase of length exhibited by the hypocotyl in the two days previous to the indicated age.

porcentaje de crecimiento frente al tiempo para tres zonas representativas del órgano. Para las zonas B y C, se aprecia un máximo en la velocidad de crecimiento en el intervalo de 9 a 11 días y para la zona A en el intervalo de 11 a 13 días de edad. posterior al máximo de las restantes zonas. Este retraso en el crecimiento de la zona A, probablemente se debe a que inicialmente una parte importante de dicha zona es meristemática y por tanto su elongación celular mínima. Las curvas son decrecientes para las zonas D y E, en donde el óptimo de crecimiento se da de 8 a 10 y de 7 a 9 días, respectivamente. Las zonas F y G muestran un crecimiento inapreciable a lo largo de la experiencia, y las oscilaciones representadas en la figura 3 se deben a errores propios del muestreo, pese a los rigurosos criterios de selección seguidos (ver Material y Métodos). Dicho error puede alcanzar valores próximos al 40%, como indica la figura 3.

En todas las zonas, una vez rebasada la edad del crecimiento máximo, éste disminuye hasta que finalmente se anula. La edad a la cual cesa el crecimiento varía según la zona, de forma que cuanto mayor es la distancia a los cotiledones antes se detiene su crecimiento. Así, la zona A sigue creciendo apreciablemente hasta los 17 días; B hasta los 13; C y D hasta los 11; E hasta los 9 días y F y G no crecen prácticamente desde el inicio de la experiencia (tabla 1).

La zona de elongación (ZE) del hipocotilo estará constituida en cada edad por aquellas zonas que presenten el máximo crecimiento. Para determinar su localización, y teniendo en cuenta el error de muestreo, se han excluido de la ZE las zonas cuyo crecimiento es inferior al 60% (tabla 1). Siguiendo este criterio, sólo al-

Intervalo Zonas	Intervalo				
	7-9 días	9-11 días	11-13 días	13-15 días	15-21 días
A	4	53	175	45	56
B	54	218	75	15	4
C	50	300	13	-4	15
D	130	95	-11	12	-11
E	94	8	29	-20	40
F	40	-21	36	-13	-17
G	7	10	4	3	-10

TABLA 1. Crecimiento relativo experimentado por las diversas zonas del hipocotilo en intervalos de crecimiento de dos días. Se indica para cada periodo de crecimiento la zona de elongación.

Relative growth exhibited by the several zones of the hypocotyl in periods of growth of two days. The elongation zone for each period of growth is indicated.

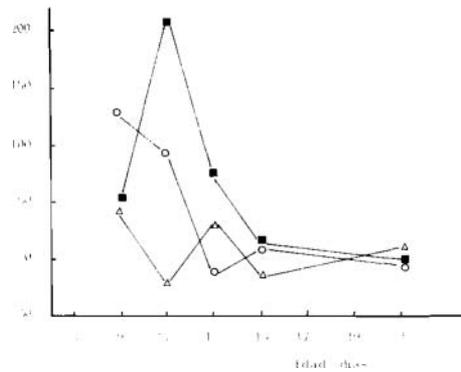


FIGURA 3. Variaciones del crecimiento relativo con la edad. Zona B (cuadrados) (cinética similar en las zonas A y C); zona D (círculos) (similar en E) y zona F (triángulos) (similar en G). El % de crecimiento se obtiene a partir del incremento de longitud que experimentan las zonas, en los días anteriores a cada edad.

Variations with age of the relative growth. Zone B (squares) (the kinetic for the zones A and C is similar); zone D (circles) (similar for E) and zone F (triangles) (similar for G). The percentage of growth is obtained from the increase of length that the zones exhibit in the two days previous at each age.

guna pequeña porción (inferior o superior) de las zonas excluidas podna formar parte de la zona de elongación, por lo que el error cometido se considera despreciable. En el período de crecimiento de 13-15 días los valores de crecimiento son sólo ligeramente superiores al error de muestreo. No obstante, la ZE, caso de existir, estana ubicada en la parte superior de la zona A.

En la tabla I puede apreciarse cómo el tamaño de la ZE vana con la edad, alcanzando un óptimo en el periodo de 9-11 días y desapareciendo prácticamente a los 21 días. De igual forma, puede comprobarse un desplazamiento ascendente de dicha ZE con la edad.

B) ESTUDIO MICROSCÓPICO

Localización de la zona meristemática. Cuando se observa al microscopio un corte longitudinal del hipocotilo se aprecia, en la parte superior de la zona A, un conjunto de células pequeñas en forma de cúpula que identificamos como células meristemáticas (fig. 4A). Mientras dura el crecimiento del hipocotilo puede localizarse en el microscopio la zona meristemática siempre en la parte superior de A, pero una vez que ha cesado el crecimiento de este órgano la

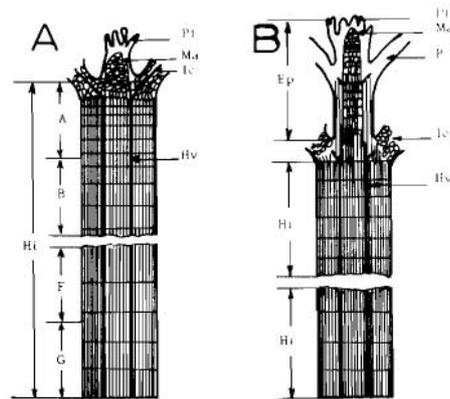


FIGURA 4. Esquema de un corte longitudinal de una plántula de altramuç de 7 días (A) y 20 días (B) de edad. Escala aproximada 3:1. Tamaño de células unas 50 veces mayor que el correspondiente a la escala: Hi=hipocotilo; Hv=haz vascular; Ic=inserción del cotiledón; Ma=meristemo apical; Pf=primordios foliares; P=Peciole; Ep=epicotilo.

Schema of the longitudinal section of lupine seedling at two ages: 7 days (A) and 20 days (B). Approximate scale 3.1. Size of cells about 50 times greater than the corresponding to the scale. Hi=hypocotyl; Hv=vascular bundle; Ic=juntion of cotyledon; Ma=apical meristem; Pf=foliar primordia; P=petiole; Ep=epicotyl

TABLA 11. Estudio microscópico de las dimensiones de diversos tejidos y células, en zonas de diferente localización en el hipocotilo de altramuç, a edades fisiológicas distintas. Los resultados se expresan en μm y corresponden a valores medios de 10 muestreos. Se indica la desviación típica. *a* y *b*, diámetros celulares obtenidos en cortes transversales; *c*, longitud celular obtenida en cortes longitudinales.

Microscopic study of several tissues and cells, in zones of variable localization in the lupine hypocotyl, at different ages. The data are expressed in μm , and correspond to the mean of 10 measurements. The typical deviation is indicated *a* and *b*, cell diameters measured in transversal sections; *c*, cell length measured in longitudinal sections.

DIMENSIONES DE LAS CELULAS EN LOS TEJIDOS		CORTEZA			CILINDRO VASCULAR			MEDULA			
		ZONA A	ZONA C	ZONA G	ZONA A	ZONA C	ZONA G	ZONA A	ZONA C	ZONA G	
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
VESPESOR DE LOS TEJIDOS	6 días	941±54	9952±58	1024±87	226±65	2422±100	178±80	10791±33	935±48	10962±50	
	10 días	932±112	1217±4	849±96	251±266	209±51	196185	10211100	1192±63	10292±25	
	18 días	987±25	10292±108	941179	180±75	203±90	181171	11462159	11462±8	9561110	
DIMENSIONES DE LAS CELULAS EN LOS TEJIDOS	EPIDERMIS	6 días	25±3'0	2224'0	—	1812'0	1910'9	—	23±2'8	19±0'9	—
		10 días	20103	26160	—	29±0'3	26±0'6	—	161±0'4	24±0'9	—
		18 días	31170	21±2'8	—	27150	30±10'0	—	21±0'9	2010'3	—
	MEDULA	6 días	4524'9	35199	46±9'6	481±1'9	45±3'3	81±4'9	41±3'5	30±5'4	861152
		10 días	44±4'9	43109	70±21'2	48±0'1	45±3'0	123±1'9	48±10'0	481100	103±8'0
		18 días	65±4'0	62±0'9	250±88'3	4324'9	41±4'9	142120'3	391±9'1	43113'1	1251±0'1

zona meristemática se desplaza de esta posición, observándose ahora en el ápice del epicotilo (fig. 4B). Este desplazamiento es el responsable de la desaparición posterior de la zona de elongación del hipocotilo (y por tanto de la detención de su crecimiento). así como del rápido crecimiento que a partir de este momento se detecta en el epicotilo.

Variación con la edad de parámetros celulares. De los resultados obtenidos al estudiar las dimensiones de diferentes tejidos y células constituyentes de este órgano se concluye que el único parámetro de los estudiados, que vana apreciablemente con la edad y localización en el hipocotilo, es la longitud celular de parénquima tanto en médula (tabla 11) como en corteza (fig. 5). Los restantes parámetros estudiados (diámetros celulares, espesor de corteza, médula y cilindro vascular, tabla 11) no presentan variaciones significativas. En ningún caso se ha detectado formación de xilema secundario durante el período de crecimiento estudiado (hasta 18 días de edad). Este dato, unido al valor prácticamente invariable de diámetros celulares y espesor de tejidos y órganos, indica que durante el período estudiado sólo se produce crecimiento primario (en longitud) pero no secundario (grosor) de la plántula de altramuç.

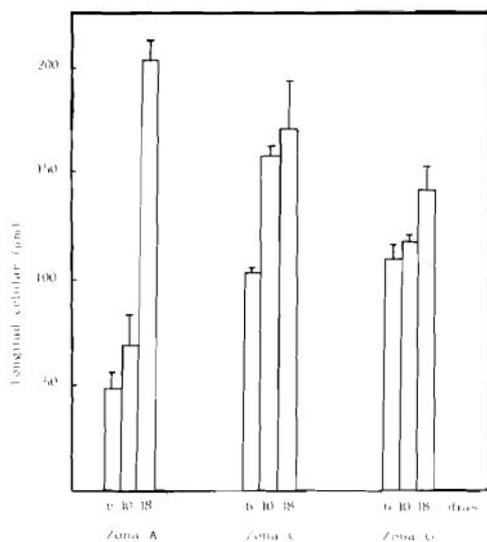


FIGURA 5. Variación con la edad de la longitud celular (μm) en corteza (segunda capa próxima al cilindro vascular) en distintas zonas del hipocotilo. Las barras indican la mitad de la desviación típica.

Variation of the cellular length (μm) in cortex (second layer near the vascular cylinder) with age in different zones of the hypocotyl. The vertical bars represent a half of the typical deviations.

El dato más significativo y característico de este crecimiento primario del hipocotilo, es la heterogeneidad en la longitud celular para las distintas zonas del órgano, tanto para edades jóvenes (6 días), como al final del período de crecimiento (18 días; fig. 5). Como era de esperar, a los 6 días la longitud celular aumenta progresivamente con la distancia al ápice, debido a la mayor edad fisiológica de las zonas inferiores, cuyo crecimiento está prácticamente anulado, cuando en las zonas superiores más jóvenes, la elongación celular sólo acaba de iniciarse. De hecho, existe una buena correlación entre los períodos de máximo crecimiento tanto en longitud celular (fig. 5) como en el tamaño de zonas (fig. 3).

Menos previsible es el hecho de que la longitud celular final sea diferente según la localización en el hipocotilo, y así, en la figura 5 se aprecia que una vez finalizado el crecimiento del órgano la longitud celular disminuye del ápice a la base. Este resultado no parece atribuible a que las zonas superiores (por ejemplo, la A) mantienen su crecimiento durante un período de tiempo superior al de las zonas inferiores, ya que, en contraste, la velocidad relativa nunca es demasiado grande (tabla I). Más bien hay que pensar en alguna causa relacionada con la distinta localización de las células en el órgano. En este sentido, se han observado gradientes de naturaleza diversa a lo largo del hipocotilo, tales como niveles de auxina (ORTUNO, 1979), metabolismo auxínico (MONTALBÁN, 1981; CABALLERO, 1982) y actividades enzimáticas AIA-oxidasa (SABATER, 1978). De igual forma, cabe pensar en la influencia de otros parámetros relacionados con la localización en el órgano, como presión física soportada, velocidad de transporte de auxinas, diferentes gradientes hormonales (citoquininas, giberelinas, etc.), polaridad celular, etc.

Restan por estudiar algunos parámetros celulares cuya distribución y variación con la edad pueden suministrar importante información adicional para completar el conocimiento del proceso de crecimiento de esta planta. Así, la variación del número y tamaño de elementos de xilema, espesor de paredes celulares, etc., serán objeto de próximos trabajos. De igual forma, el estudio del crecimiento del órgano deberá ser ampliado a otras magnitudes relacionadas con el crecimiento, como variación de peso y variación del potencial hídrico y sus componentes

BIBLIOGRAFÍA

- ALONI, R. & ZIMMERMANN, M. H. 1983. The control of vessel size and density along the plant axis. A new hypothesis. *Differentiation*, 24: 203-208.

- CLELAND, R. 1976. Kinetics of hormone-induced H^+ excretion. *Plant Physiol.*, 58: 210-213.
- CABALLERO, M.. 1982. *Metabolismo de AIA- C_1^{14} y AIA- C_2^{14} aplicado a hipocótilos de altramuz (*Lupinus albus*)*. Naturaleza de los productos formados. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- MONTALBAN, A. 1981. *Metabolismo del ácido indolacético y su relación con el crecimiento en hipocótilos etiolados de *Lupinus ulbus**. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- ORIUNO, A. 1979: *Distribución del ácido indolacético y su relación con el crecimiento en hipocótilos de altramuz*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- RAY, P. M. 1973. Regulation of β -glucan synthetase activity by auxin in pea stem tissue. II. Metabolic requirements. *Plant Physiol.*, 51: 609-614.
- RAYLE, D. & CLELAND, R. 1977. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Developmental Biology*, 11: 187-214.
- SABATER, F., SÁNCHEZ, J., NÚÑEZ, C. & CUELLO, J. 1978. Distribution of IAA oxidase and peroxidase activity in hypocotyls of lupine. *I Congress F.E.S.P.P.* Edimburgh.
- THIMANN, K. V. 1937. On the nature of inhibitions caused by auxin. *Am. J. Botan.*, 24: 407-412.