

EL CICLO CELULAR EN VEGETALES. Su estudio, importancia y aplicaciones.

DAVID TALLEDO
CAROLA ESCOBAR

Laboratorio de Biología Celular y Genética,
Sección de Citogenética,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Ricardo Palma,
Apto. 138, Lima - PERU.

RESUMEN

Se presenta una guía para determinar la frecuencia y duración de cada fase del ciclo celular y de todo el ciclo, así como para ubicar el momento apropiado para la toma de muestras para investigaciones sobre conteos y morfología cromosómica. Se describe uno de los métodos utilizados para desarrollar este tipo de estudios y se presentan cuadros y gráficos para facilitar la sistematización, interpretación y discusión de los resultados. Se presentan ejemplos de interpretación de los mismos en *Zea*, *Phaseolus* y *Ullucus*. Se presta especial atención a los factores que condicionan las modificaciones del ciclo celular y la formación de poliploides, señalando la importancia de este tipo de estudios y sus posibilidades de aplicación para la solución de problemas teóricos (ubicación sistemática, esclarecimiento de la filogenia), así como con fines prácticos (compatibilidad para los cruzamientos, evaluación de la velocidad de crecimiento).

PALABRAS CLAVES: Vegetales, ciclo celular, poliploidización.

SUMMARY

This paper presents a guide to determine the frequency and duration of each cellular cycle phase and of the whole cycle as well as to locate the appropriate time for sampling in order to make researches on counting and morphology of chromosomes. One of the methods used to develop this type of study is described and tables and graphics are included in discussion of the results. Examples of interpretation are presented in *Zea*, *Phaseolus* and *Ullucus*. The paper focuses on the factors conditioning the changes of the cellular cycle and the formation of polyploids, highlighting the significance of this type of studies and its possibilities of application for the solution of theoretical problems (systematic location, clearing of phylogenetics) and for practical purposes as well (compatibility for crossing-over, assessment of the growth rate).

KEY WORDS: Vegetables, cell cycle, polyploidization.

INTRODUCCION

El número y morfología de los cromosomas de los organismos eucariontes se estudian con mayor facilidad durante el período de su mayor condensación, la metafase mitótica. Sin embargo, ésta es sólo una etapa, por lo general bastante breve, del ciclo celular; es decir, del ciclo de transformaciones de la célula ligado al proceso de su reproducción. Para desarrollar análisis cariotípicos a nivel de conteos y evidenciación de la morfología cromosómica es indispensable ubicar el preciso momento en el cual los cromosomas presentan su mayor grado de condensación. Este período suele durar sólo algunos minutos y depende de factores genéticos y ambientales. El estudio del ciclo celular nos permite eliminar el factor del azar y utilizar criterios objetivos para la toma de las muestras (Del Campo, 1988; Smirnov, 1991).

Sabemos que el ciclo celular no siempre termina con la división celular y que su regulación genética condiciona que cada una de las fases que lo conforman exija de una transcripción y de la síntesis de proteínas específicas (Van't Hoff, 1973). Por ello, el estudio del proceso puede ayudar a esclarecer las causas que determinan el

importante rol de la poliploidía en el proceso de diversificación de las especies propias de zonas montañosas, como es el caso de las raíces y tuberosas andinas, así como los mecanismos de formación de poliploides. También puede coadyuvar a esclarecer las causas de la divergencia de reportes en cuanto a números cromosómicos en estas especies (y la falta de regularidad en la distribución de estos números), así como de la variación somaclonal observada en algunos cultivos reproducidos *in vitro* (Cárdenas & Hawkes, 1948; Bolkhovskikh *et al.* 1969; Molina & Naranjo, 1987; Talledo, 1991; Talledo *et al.* 1993; Larkka *et al.* 1992).

ANTECEDENTES

EL CICLO CELULAR EN VEGETALES: SU ESTUDIO, IMPORTANCIA Y APLICACIONES.
EL CICLO CELULAR: GENERALIDADES.

La mayor parte de nuestros conocimientos acerca de la morfología de los cromosomas de los organismos eucariotes se basa en resultados obtenidos durante el período de su mayor condensación, la metafase mitótica.

Sin embargo, la metafase es sólo una etapa, por lo general bastante breve, del ciclo celular (Talledo *et al.*, 1993).

Como sabemos, el ciclo celular es el mecanismo universal de reproducción de las células eucariotes cuyo evento principal es la reproducción y duplicación del número de cromosomas, siendo la mitosis el mecanismo de división de los cromosomas, del núcleo y de toda la célula. Durante la mitosis se observa la destrucción de la membrana nuclear y la formación del huso acromático, que garantiza la distribución equitativa de los cromosomas (cromátidos) espiralizados, y previamente duplicados, entre las células hijas.

El ciclo mitótico o ciclo celular se extiende desde la formación de una célula, por división de la célula madre, hasta su propia división en 2 células hijas. Esta unidad de tiempo representa el ciclo de vida de una célula en proliferación y constituye la unidad de repetición en todo proceso de reproducción celular, siendo su principal característica su naturaleza cíclica (Del Campo, 1988).

El ciclo celular del organismo en crecimiento comprende 2 etapas: la interfase, frecuentemente prolongada, y la mitosis, más breve (de 1/7 a 1/10 de todo el ciclo celular), que consta de 4 fases (profase, metafase, anafase y telofase). Durante la interfase es posible observar un período «S» de síntesis, en el que se produce la replicación de los cromosomas, así como 2 períodos «G»: G_1 , anterior al período «S» y G_2 , posterior a él. De manera que durante el período comprendido entre la telofase de un ciclo celular y la fase «S» de la interfase siguiente los núcleos presentan la cantidad de material genético propia de la especie, que frecuentemente corresponde al complemento diploide de cromosomas. Se ha establecido que durante la fase «S» esta cantidad aumenta paulatinamente y a partir del período G_2 hasta la siguiente telofase es el doble. Así mismo, la duración del ciclo celular y de sus fases no es igual en los diferentes tipos de células de un organismo y varía significativamente durante la ontogénesis (Smirnov, 1991).

CONTROL GENÉTICO DEL CICLO CELULAR

Por otro lado, el ciclo celular no siempre termina con la división celular. Los períodos G_1 y G_2 no son solamente espacios de transición al período «S» y a la mitosis, sino también espacios de decisión sobre si continúa o no la célula en ciclo de división o se separa temporal o definitivamente de él (Del Campo, 1988). Sabemos que este ciclo es regulado genéticamente: cada una de sus fases exige de una transcripción y de la síntesis de proteínas específicas (las proteínas de la división). Estas proteínas determinan el inicio del ciclo

celular, de la replicación, de la finalización del período S, el paso de G_2 hacia la mitosis y el flujo de cada fase de esta última (Epifánova, 1973; Prescott, 1976). Algunas de estas proteínas aún no han sido identificadas, pero su efecto biológico se manifiesta claramente; por ejemplo, el bloqueo de la síntesis proteica en un momento determinado del período G_1 (y sólo en ese momento) evita que las células pasen al período S (Brooks, 1977). Rao *et al.* sugirieron en 1978 que la propia duración del período G_1 se determina por la velocidad de síntesis de los iniciadores y otros factores proteicos de la replicación. Se han encontrado más de 9 proteínas características sólo para el período G_2 y no existen proteínas similares ni en otras fases del ciclo, ni en células bloqueadas en G_2 por sustancias citostáticas (sustancias que paralizan el ciclo celular). Por ejemplo, luego de la fusión en cultivo sincronizado de células bloqueadas y células normales en G_2 , las primeras iniciaron sus mitosis (Al-Bader *et al.* 1978). Por otro lado, las proteínas sintetizadas en el período G_2 determinan también el curso de la citocinesis (Lasselain *et al.* 1978).

La mitosis y sus resultados dependen funcionalmente del estado de los genes que controlan los procesos del ciclo celular. Esta relación puede ser ilustrada con células mutantes termolábiles respecto a la velocidad de su crecimiento. Por ejemplo, a temperaturas diferentes a la óptima, cuando crecen intensamente, estos mutantes presentan diferentes aberraciones de la mitosis: curso defectuoso de la profase con formación de estructuras atípicas, células detenidas en metafase con características similares a C-mitosis (mitosis bloqueadas con colchicina); en ocasiones los procesos post-metafásicos se producen irregularmente y la membrana nuclear se forma alrededor de un grupo de cromosomas fusionados, dando lugar a células bi- y multinucleadas (Wang, 1974, 1976; Wissinger & Wang, 1978). Así mismo, se conocen líneas mutantes que presentan citocinesis termolábiles, aún cuando las demás fases y procesos permanezcan normales (Smith & Wigglesworth, 1972; Shiomi & Sato, 1978). Se considera que en los casos descritos mutan los genes que controlan la síntesis de las proteínas del huso acromático dando lugar a estructuras defectuosas y con proteínas incapaces de orientarse en condiciones que no sean las óptimas.

Brodsky y Urivayeva (1970) clasifican los ciclos celulares incompletos en 2 tipos:

1° Cuando se reducen las fases finales de la mitosis y como resultado (de esta mitosis poliploidizante) se forma una célula con un complemento cromosómico duplicado y separado.

2° Cuando se reducen todas las fases de la mitosis (las células se bloquean en G_2) y como resultado se forma

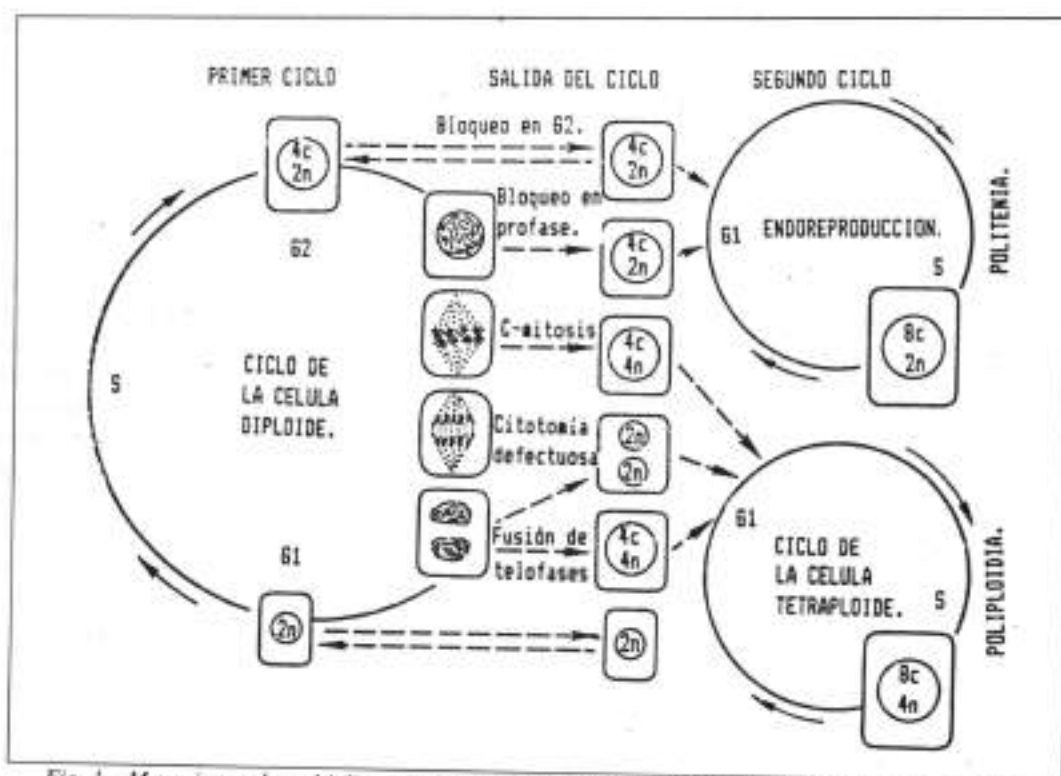


Fig. 1. Mecanismos de multiplicación del genoma durante el ciclo celular: n: complemento haploide de cromosomas; c: nivel haploide de ADN. (Tomado de Brodsky, Urivayeva, 1981.)

una célula con cromosomas (cromátides) duplicados pero que no se separan; en el siguiente ciclo, con diplocromosomas y, luego de varias endorreproducciones, con cromosomas politéticos (fig. 1).

Estos reportes nos indican que tanto las mitosis normales como su transformación hacia ciclos mitóticos incompletos y hacia la poliploidización están condicionados por la realización del programa genético.

MODIFICACION DEL CICLO CELULAR

La posibilidad de inhibir cualquier fase de la mitosis luego de la culminación de la anterior está condicionada por la regulación por fases del ciclo celular (Mezia, 1963; Epifánova, 1973). El bloqueo de la mitosis no impide la reproducción de los cromosomas; a su vez, la separación de los cromosomas y formación de los núcleos hijos no son pre-determinantes para la citotomía. El uso de inhibidores de la mitosis, que impiden la síntesis de las proteínas indispensables para el curso de una determinada fase, permite modelar el proceso de poliploidización. Las concepciones sobre las «proteínas de división» inicialmente se basaban en la permanencia de la célula en una u otra fase del ciclo después del bloqueo de la síntesis proteica en la fase anterior. La acción del inhibidor generalmente causaba poliploidía. Por ejemplo, la colchicina (Blakeslee & Avery, 1937, cit. de Escobar, 1991; O'Mara, 1939), el para-diclorobenceno (Meyer, 1945), el alfa-bromonaftaleno (Morrison, 1953) y la 8-hidroxiquinolina (Tjio & Levan, 1950) inhiben la

formación del huso acromático y, por lo tanto, la separación de los cromosomas duplicados; la 8-azaguanina reorienta las células del meristemo radicular de *Pisum* hacia la endorreproducción (Nuti Ronchi *et al.* 1965). Así mismo, la acción de la hidroxilamina sobre las células vegetales, además de otros efectos, bloquea el paso de G₁ hacia la mitosis. En los ciclos siguientes se observan metafases con diplocromosomas (Lin & Walden, 1974). Son especialmente interesantes los trabajos de Nagl (1970, 1978) y Nagl *et al.* (1976) en los que se muestra claramente el bloqueo de las fases intermedias y finales de la mitosis con la acumulación correspondiente de células 4C (definiendo como C a la cantidad de material genético contenido en el complemento haploide) por acción de la actinomicina sobre células diploides (2C) del meristemo radicular de cebolla.

Los experimentos con inhibición parcial de los procesos mitóticos y la poliploidización, como consecuencia de ello, posiblemente reproducen situaciones observables durante el desarrollo normal de los organismos. Sin embargo, el curso incompleto de la mitosis durante la ontogénesis no está condicionado por la acción de inhibidores, si no por el hecho de que no se completa el período preparatorio de la misma debido a la concurrencia de las funciones celulares (Brodsky & Urivayeva, 1981).

El carácter no-casual de la poliploidía se infiere por la amplia difusión de células poliploides en plantas y animales, así como por la regularidad de su formación durante la ontogénesis. Sobre la determinación de la

poliploidización nos habla su fuerte relación con periodos determinados del desarrollo. Esto nos demuestra la necesidad del fenómeno, así como las ya esclarecidas ventajas del genoma poliploide con respecto al diploide para el cumplimiento de algunas funciones histológicas o en la determinación de la vitalidad del tejido. Barlow (1978) señaló que la poliploidía puede ser una estrategia evolutiva. El éxito de esta estrategia no necesariamente estará condicionado por alguna ventaja funcional inmediata de la célula poliploide, si no que puede estar determinado por la mayor capacidad de los órganos poliploides, respecto a los diploides, para resistir la influencia del medio ambiente (incluyendo daños físicos), como resultado de lo cual el organismo soporta mejor el proceso de selección.

LA MITOSIS Y LA DIFERENCIACION

Cada tipo celular esta formado por un conjunto integral de células predecesoras, intermedias, en proceso de maduración y formas finales en funcionamiento. La composición y actividad de estos conjuntos están determinados por la velocidad de la división celular, que garantiza el crecimiento o renovación de los tejidos, así como la permanencia (duración) de las formas finales, lo que a su vez depende de la fisiología del tejido. Las células diferenciadas conservan su capacidad mitótica en los tejidos donde permanecen por períodos prolongados, donde no hay renovación celular o ésta se produce muy lentamente. Estos tejidos no presentan reservas troncales y la fuente principal del crecimiento de su masa es la reproducción de las células diferenciadas (Brodsky & Urivayeva, 1981).

Una determinada diferenciación se caracteriza no sólo por una composición peculiar de sus proteínas, si no también por los límites de su producción. Está claro que además de las proteínas histoespecíficas, que no son indispensables para su supervivencia, en las células diferenciadas se sintetizan componentes estructurales renovables y enzimas necesarias para el funcionamiento vital. En las células capaces de dividirse por mitosis se sintetizan proteínas especiales sin las cuáles éstas no podrían avanzar por el ciclo celular, replicar el ADN ni formar el aparato de la división. Durante el ciclo celular se sintetizan proteínas cromosómicas y se duplica la masa de las células. De forma que la masa total de proteínas producidas en el ciclo mitótico de las células diferenciadas es bastante grande. Se han observado variaciones interesantes del flujo de la mitosis en células en proceso de diferenciación. Prokofieva-Belgovskaya (1959, 1960) observó la aparición de células binucleadas y mitosis con diplocromosomas en células de almacenamiento de almidón en tubérculos de papa. Se registró tanto la influencia de la función del tejido sobre el flujo de la mitosis como la inhibición de la formación de almidón cuando se estimulaban las mitosis. La no-selectividad de

la inhibición es un argumento a favor de la competitividad entre la formación de almidón y la proliferación. No es improbable que el mecanismo de poliploidización generativa, de duplicación del genoma en las células de la vía sexual, sea el mismo. En este caso la posibilidad de aparición de poliploides por mutaciones es pequeña: para que el proceso se produzca se debería presentar una misma mutación en forma simultánea en las células sexuales masculinas y femeninas en un número bastante grande de organismos. La variación del ritmo de diferenciación y, como consecuencia, del flujo de la proliferación de las células sexuales puede producirse de manera simultánea en varios grupos de organismos si, por ejemplo, éstos se encuentran en condiciones de aislamiento en hábitats que presentan diferentes variaciones ambientales, como es el caso de las especies que se desarrollan en la Zona Andina (National Research Council, 1989; Talledo, 1991; Jardín Botánico de Córdoba - España, 1992). Como resultado del acortamiento del programa del ciclo celular se puede producir síntesis irregular del ADN, endorreproducción o poliploidía. La selección natural eliminará o no a la progenie cuyo genoma haya variado. Una vía para verificar la posibilidad de estas variaciones es el estudio de poblaciones aisladas de una sola especie y la determinación de la cantidad de ADN de sus genomas (Brodsky & Urivayeva, 1981).

La importancia de la poliploidía somática consiste en la multiplicación de genes estructurales en aquellos tejidos donde por alguna causa no puede aumentar el número de células. La comparación de los parámetros del ciclo mitótico en 4 especies que se diferenciaban por el contenido de ADN en su genoma diploide en aproximadamente 20 veces permite establecer que los períodos G₁ y S aumentan en aquellas especies que presentan un genoma de mayor peso (Grosset & Odartchenko, 1975 a, b). Como veremos mas adelante, en células vegetales se ha encontrado correlación entre el peso del genoma y la duración del ciclo.

PECULIARIDADES DE LAS CELULAS VEGETALES

El aumento de la cantidad de ADN en las células vegetales puede estar condicionado tanto por poliploidía (aumento del número de cromosomas durante el desarrollo de algunas células), como por politenia (multiplicación del número de cromonemas en cromosomas que no se dividen). Los mecanismos de formación de células poliploides y la importancia funcional del proceso no difieren en principio en vegetales y animales.

Sin embargo, las células vegetales presentan algunas peculiaridades. Una de las diferencias principales de las células vegetales con respecto a las animales es la gran variabilidad del peso del genoma diploide. En las plantas angiospermas los valores de 2C para el ADN varían aproximadamente 500 veces: desde 0.5 pg (picogramos)

en *Arabidopsis thaliana* hasta 255 pg en *Fritillaria assirica* (Ivanov, 1978). Las células de muchas plantas contienen mucho más ADN que las de los mamíferos, aunque no está clara la importancia de este hecho (Prokofieva-Belgovskaya, 1986). Se ha establecido que el volumen del núcleo puede duplicarse y multiplicarse manteniendo un número constante de cromosomas; por ejemplo durante el crecimiento de la célula diploide y en diferentes fases de secreción (Jesin, 1967). En una serie de trabajos se han reportado observaciones morfológicas de macronúcleos en células vegetales. Estos resultados son más numerosos que las determinaciones citofotométricas

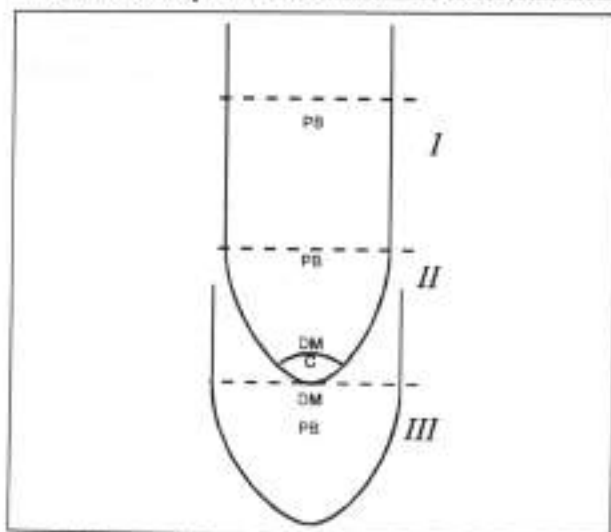


Fig. 2. Esquema de las zonas de la raíz, indicando las peculiaridades de la proliferación celular: I: Zona de alargamiento, II: Meristemo, III: Cofia. DM. Divisiones mitóticas, PB: Mitosis poliploidizantes y bloqueo en la fase G2 del ciclo, C: Centro en reposo. (Tomado de Tschermack-Woess, 1956; Ivanov, 1974; Barlow, 1977b; cit. de Brodsky, Urivayeva, 1981).

del contenido de ADN (Nagl, 1978). Sin embargo, la poca confiabilidad del criterio volumétrico para evaluar el nivel

de ploidía es evidente, aunque sólo sea por la diferente densidad óptica de los núcleos, condicionada por un mayor grado de condensación. El criterio del tamaño puede ser utilizado con éxito siempre y cuando se mantenga un control citofotométrico o se utilicen criterios adicionales de identificación (Pijnacker *et al.* 1989).

Por otro lado, existen diferencias más específicas. Veamos algunos ejemplos:

1° En células radiculares. Ivanov (1974) señala una serie de peculiaridades importantes del crecimiento y desarrollo de las células de la raíz. Como se sabe, en el ápice radicular se observan células de un centro en reposo, del meristemo y de la zona de alargamiento. En el centro en reposo se localizan las células troncales de los tejidos de la raíz. El meristemo es la zona de multiplicación celular: aquí y en la cofia, en sus capas próximas a la raíz, se observan las mitosis (Foard, 1970) (Fig. 2). El número de capas celulares del meristemo depende del grosor de la raíz. Los meristemos de raíces muy finas contienen alrededor de 10 capas, mientras que en raíces gruesas es posible encontrar varios cientos de ellas.

Con respecto a la duración del ciclo celular, ésta depende del peso del genoma: cuanto mayor es la cantidad de ADN tanto mayor es la duración del ciclo y el período de síntesis. Esta relación, señalada por primera vez por Van't Hoff y Sparrow en 1963, ha sido estudiada por muchos autores. El espectro de resultados para las diferentes especies es grande, pero la correlación entre el contenido de ADN en el genoma diploide y la duración del ciclo mitótico es indudable (Ivanov, 1978) (Fig. 3).

Se puede relacionar la duración del ciclo con la ecología de la planta. La cantidad de ADN en el genoma diploide y el tiempo de reproducción de las células

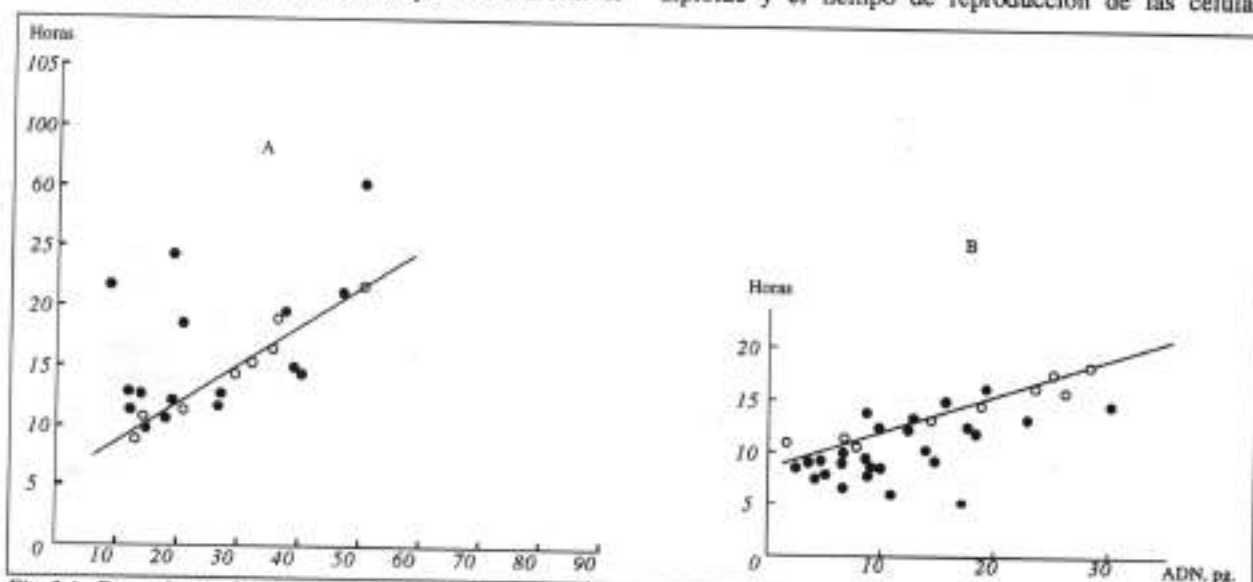


Fig. 3. A. Dependencia de la duración del ciclo celular (en horas) del contenido de ADN en el meristemo de plantas Monocotiledóneas. Los puntos y círculos representan diferentes especies vegetales. (Ivanov, 1978). B. Dependencia de la duración del ciclo celular (en horas) del contenido de ADN en el meristemo de plantas Dicotiledóneas. Los puntos y círculos representan diferentes especies vegetales. (Ivanov, 1978).

frecuentemente forman una curva en crecimiento cuando comparamos las plantas efímeras, las anuales y las perennes (Bennett, 1972). Las formas diploides y poliploides de una misma especie por lo general presentan ciclos similares.

La diferenciación celular empieza en el meristemo. El número de mitosis disminuye conforme nos aproximamos a la zona de alargamiento. La etapa de alargamiento es específica para el desarrollo de las células vegetales y está condicionada por la hidratación del citoplasma y la acumulación en el mismo de una serie de sustancias, incluyendo proteínas. Esto permite considerar que el crecimiento de las células consiste en su alargamiento («crecimiento por alargamiento»). En el proceso de alargamiento aparecen las principales diferencias de las células de los tejidos. El alargamiento no siempre bloquea la mitosis y la síntesis de ADN se produce en muchas células diferenciadas. Por lo general, en las células de la zona de alargamiento no se producen mitosis luego de la replicación del ADN; las mitosis tampoco son frecuentes en las células distales del meristemo.

Como resultado de la síntesis de ADN sin mitosis posterior, en el meristemo y en la zona de alargamiento se acumulan células con una cantidad de ADN duplicada y hasta cuadruplicada (Van Parijs & Vandendriessche, 1966; Brunori, 1971). Así mismo, el procesamiento de las raíces con colchicina, que inhibe la mitosis, no evita la acumulación de ADN y el crecimiento de las células (Barlow, 1977). En los tejidos radiculares también se han observado mitosis poliploides (Sinnott, 1960; Matthyse & Torrey, 1967; Libbenga & Torrey, 1973; Hervas, 1975). Cuanto más alejadas están las células del extremo de las raíces; es decir, cuanto más han avanzado en su diferenciación, tanto mayor es la cantidad de mitosis tetra- y octaploides. Por ejemplo, cerca al extremo de la raíz de *Pisum sativum* L. el 75% de las mitosis es diploide; a una distancia de 5 mm. del extremo de la raíz esta cantidad será sólo del 5% y el resto será poliploide (Libbenga & Torrey, 1973).

Como hemos visto, luego de la reproducción celular, en las capas apicales del meristemo se produce endoreproducción y en las capas distales, mitosis poliploidizantes; éstas continúan en la zona de alargamiento.

2° En células foliares. La endoreproducción es también característica para los tejidos foliares, especialmente para las hojas de plantas suculentas (D'Amato, 1977).

3° En órganos del desarrollo embrional. Las variaciones cuantitativas del ADN en los órganos del desarrollo embrional de las

plantas son más significativas que en los tejidos definitivos. Una gran cantidad de ADN se acumula en las células del suspensor (embrióforo), donde se observan cromosomas politénicos. (El suspensor de las plantas angiospermas es producto del blastómero basal; del otro blastómero se forma el embrión. Las divisiones del blastómero basal dan lugar a una hilera de células: el suspensor, que empuja al embrión a la parte central del saco embrional. En este momento en el saco embrional se forma el endosperma, también a través de divisiones celulares). Tanto en el suspensor como en el endosperma se pueden encontrar células gigantes, las de mayor tamaño se ubican en la parte basal del suspensor. Generalmente, las especies que presentan suspensor poco desarrollado presentan células gigantes en el endosperma (D'Amato, 1977; Nagl, 1978). El mayor número de trabajos de este tipo ha sido desarrollado en *Phaseolus*, cuyos embrióforos están formados por 100 - 150 células, la mayoría de las cuales presenta entre 4c y 64 c (Brodsky & Urivayeva, 1981).

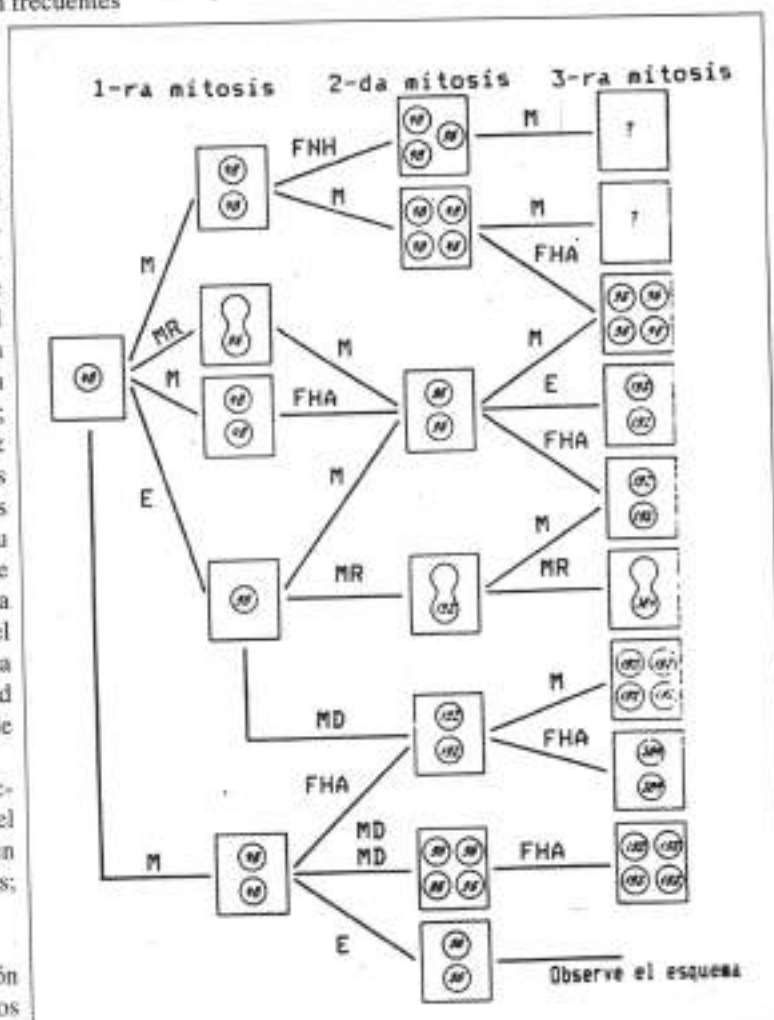


Fig. 4. Esquema de las posibles transformaciones de una célula diploide del tapetum del polen de la papa *Solanum tuberosum* ($2n=48$). M: mitosis completa, MR: mitosis reproductiva (poliploidizante), E: endomitosis, FNH: fusión de núcleos hijos, FHA: fusión del huso acromático, MD: mitosis con diplocromosomas, FHA-MD: fusión de los núcleos en las mitosis con diplocromosomas. (D'Amato, 1977).

En las plantas angiospermas las células del endosperma son originalmente triploides (3x). En especies como *Borassus flabellifer*, la palma azucarera, además de células 3x, se han encontrado células 6x, 12x, 24x, 48x y 96x (Stephen, 1974). La poliploidización en el endosperma puede ser condicionada por mitosis incompletas, lo más frecuente son bloqueos de metafases, cuando se destruye la membrana nuclear, se espiralizan los cromosomas, pero el huso acromático no se forma. Otra vía de poliploidización característica del endosperma es el bloqueo de la mitosis durante la anafase. Stephen (1973) observó también la politenización en el endospermo de maíz.

4° En el tapetum (tapete) del polen. Durante el desarrollo del tapetum del polen en papa se puede producir una serie de transformaciones del núcleo diploide (D'Amato, 1977). En la Fig. 4 se observa que las células pasan por 3 mitosis; una parte de ellas mantiene un sólo núcleo, aumentando significativamente su genoma como resultado de mitosis poliploidizantes; otra parte, la mayoría de las células, pasa por una mitosis acitocinética, transformándose en binucleadas y continúan dividiéndose por bimitosis (mitosis en células binucleadas). En algunas de estas células los complementos de la progenie se fusionan (por pares), dando lugar a células binucleadas con un mayor nivel de ploidía. Por último, en las bimitosis de un tercer grupo de células los núcleos se dividen hasta el final y se forman células tetranucleadas. La bimitosis puede repetirse, dando lugar a células bi- y tetranucleadas en un mayor nivel de ploidía. Es poco frecuente que se fusione parte de los núcleos-hijos ya formados, lo que da lugar a células trinucleadas con núcleos en diferentes niveles de ploidía.

MATERIALES Y METODOS

CONDICIONES AMBIENTALES

Para la determinación de los Índices de Fases (IF), Índice Mitótico (IM) y duración del ciclo celular en vegetales es conveniente registrar las condiciones de laboratorio (tales como temperatura, humedad relativa y presión atmosférica) durante el experimento.

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico comprende meristemos radiculares de semillas, granos o tubérculos, obtenidos a partir del extremo distal de raíces primarias o secundarias de color blanco o crema, de aspecto brillante y consistencia frágil, con una longitud aproximada de 1.0 - 1.5 cm.

CONDUCCION DEL EXPERIMENTO GERMINACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras (semillas, granos o esquejes de tubérculos) deben germinar en cámaras húmedas

confeccionadas en placas Petri de 15 x 100 mm. Previamente el interior de éstas debe ser desinfectado con alcohol al 75%, cubriéndose luego con papel filtro humedecido en agua.

Nota: En tubérculos los esquejes se separan de su base mediante movimientos rotatorios, descartándose aquellos esquejes de consistencia blanda y/o que presenten lesiones.

DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO

FIJACION

Los meristemos radiculares se colocan a diferentes horas del día en solución fresca del fijador Carnoy (Etanol absoluto + Acido acético glacial en una proporción de 3:1, respectivamente) donde permanecen por espacio de 4:00 ó más horas (hasta 6 meses como máximo) a 4°C.

COLORACION

Para la coloración de las muestras se usa orceína acética clorhídrica de acuerdo al método de Tjio & Levan (1954) modificado por Talledo y Escobar (1993).

Las raíces se transfieren a una solución A del colorante (orceína acética al 4.4% + HCl 1N, 9:1 vol.), calentándose por pocos segundos hasta obtener el desprendimiento de vapores y alcanzar una temperatura tal que sea soportada en el dorso de la mano, evitándose la ebullición y el calentamiento excesivo. Luego se deja enfriar y se repite el paso anterior tres veces. Después de ello se deja enfriar por completo.

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL SQUASH

Las porciones radiculares así teñidas se colocan sobre un portaobjetos, cortándose 1 mm del meristemo con una hoja de bisturí; el resto se descarta, eliminándose el excedente de solución A. Finalmente se agrega 1 o 2 gotas de solución B (orceína acética al 4.4% + HCl al 45%, 1:1 vol.), dejando las muestras en la misma durante 10 minutos, para luego realizar el squash con un cubreobjetos.

PRENSADO O SQUASH

Luego de colocar el cubreobjetos se golpea firme y fuertemente la muestra con una varilla de goma. Este golpe va a causar la separación de las células cuyas uniones han sido destruidas durante el tratamiento con ácido clorhídrico, incluido en la coloración. Seguidamente, con la misma varilla, se golpea repetidamente la muestra a través del cubreobjetos, en espiral, del centro hacia la periferie, para que los movimientos de «subida - bajada» de la laminilla motivados por el golpeteo permitan la disociación del tejido meristemático.

A continuación se realiza el aplastamiento presionando fuertemente la lámina con el dedo pulgar, evitando

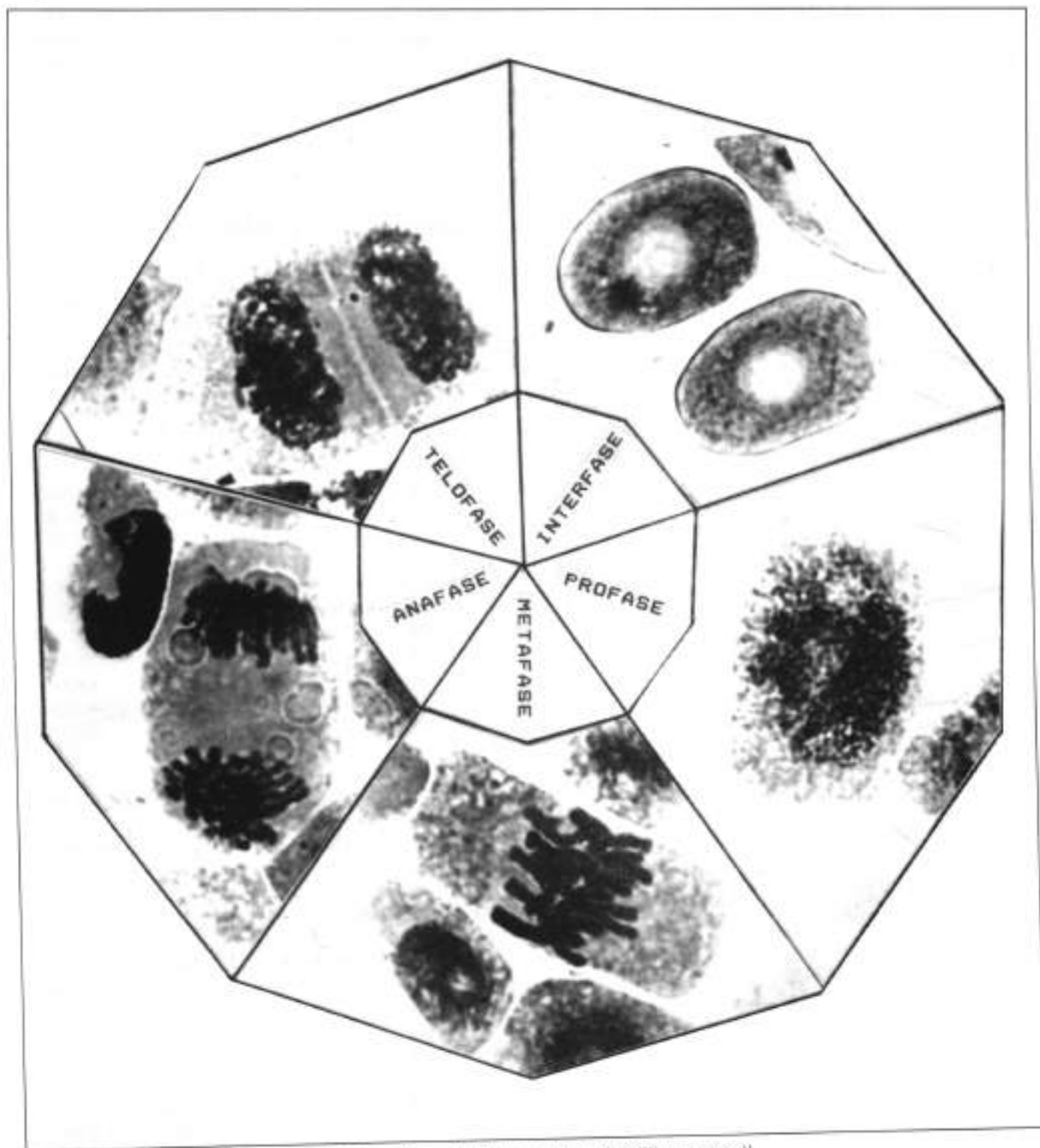


FOTO 1. Fases del ciclo celular en *Lepidium meyenii*.

Cuadro A: Evaluación de los índices de fases e índices mitóticos.

Hora T(C°) IF (%)	Células contadas	Interf.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.	IM (%)

cualquier movimiento del cubreobjetos. Es recomendable que la lámina se encuentre sobre una superficie antideslizante. Finalmente, se envuelve la lámina en papel filtro y, luego de colocarla nuevamente sobre la mesa de trabajo, se ejerce presión sobre la misma, esta vez con la parte inferior de la palma de la mano.

Nota: Para la obtención de un buen squash es indispensable que en todos los pasos mencionados la presión sea perpendicular a la lámina; lo que permite la distribución de las células en una sola capa, facilitando la diferenciación de las diferentes fases del ciclo celular.

OBSERVACION AL MICROSCOPIO: CONTAJE DE FASES - DETERMINACION DE LOS INDICES DE FASES E INDICES MITOTICOS PARCIALES.

Las muestras procesadas de cada hora son observadas al microscopio con el propósito de determinar el Índice de fases (I^F) mediante el conteo de las diferentes fases del ciclo celular (interfase, profase, metafase, anafase y telofase) en aproximadamente 1,000 células, registradas y expresadas en porcentajes (Foto 1). Finalmente la sumatoria de células en división (profase, metafase, anafase y telofase) respecto al total de células expresada en porcentajes constituye el Índice Mitótico (I^M).

Fórmulas parciales (observación por c/hora):

$$IF(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de células de cada fase}}{N^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

$$IM(\%) = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t$$

Donde: IF= Índice de fases, IM= Índice mitótico, p= profase, m= metafase, a= anafase y t= telofase.

Para facilitar el análisis de los resultados se propone un cuadro de registro de la evaluación de los índices de fases e índices mitóticos (Cuadro A). Este cuadro incluye la hora (en la cual se produjo la fijación de la muestra), el número de células contadas (no menos de 1,000/hora), las diferentes fases expresadas en porcentajes y finalmente la determinación de los índices mitóticos parciales y el Índice Mitótico total, expresados también en porcentajes:

DETERMINACION DE LOS IF E IM TOTALES Y DE LA DURACION DEL CICLO CELULAR.

Los IF(%) totales se obtienen de la división de la sumatoria de los porcentajes de cada fase de la mitosis, obtenidos para cada hora, entre el número total de horas.

Con estos porcentajes se determina el IM total mediante la sumatoria de los índices de fases en división (profase, metafase, anafase y telofase).

Fórmulas totales:

$$IF(\%) = \frac{IF\% \text{ parciales de cada fase}}{N^{\circ} \text{ de horas}}$$

$$IM(\%) = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t \text{ (IF totales)}$$

La proporción de células en las fases de la mitosis respecto al total de células de la muestra (el índice mitótico -IM) va a reflejar directamente la duración relativa de dichas fases, así como de la propia mitosis. En un sistema asincrónico, como son los cromosomas en la célula en división, esta información es insuficiente para establecer en términos absolutos la duración de cada fase individualmente. Para ello es preciso, además, conocer cuál es la duración del ciclo celular.

Para determinar la duración del ciclo mitótico es necesario evaluar la duración en horas para cada fase en un período de tiempo suficiente, durante el cual se observe claramente el inicio y el final de las mitosis en porcentajes significativos de las células de la muestra.

Cuadro B: Determinación de los IF e IM totales y de la duración del ciclo celular

Estado	Total	Interf.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.
Frecuencia						
IF (%)						
IM (%)						
Duración Hrs asumiendo un valor medio para un ciclo completo = Hrs.						

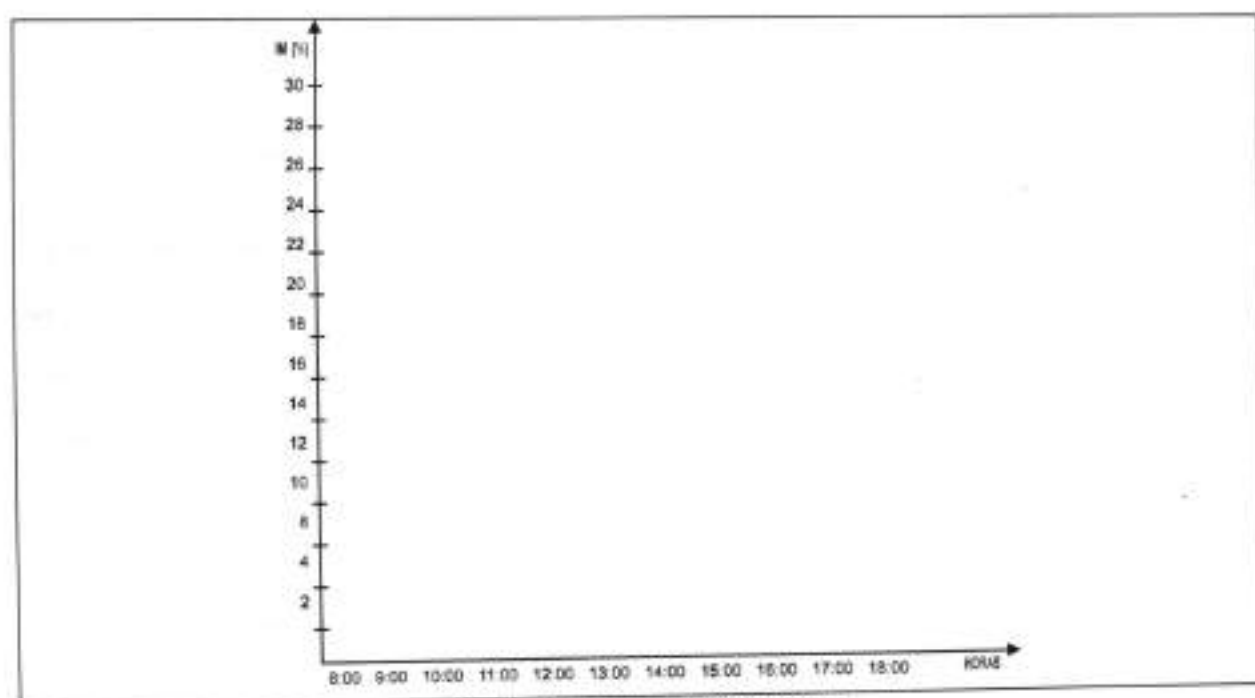


Gráfico C: Secuencia del Ciclo Celular

calculando la duración total del ciclo mediante la sumatoria de los periodos ocupados por la profase, metafase, anafase y telofase.

Para ello se precisa determinar los IF totales.
Fórmula duración CC:

CC = Valores en horas de las fases en división y en interfase.

Donde CC = ciclo celular.

Un valor elevado para el IM no nos indica que la división se produce rápidamente, si no más bien que la mitosis ocupa una gran parte del tiempo total del ciclo celular (Dyer, 1979). Este método permite determinar los valores promedio, aunque debemos tener en cuenta que se pueden presentar variaciones incluso entre las células de un mismo meristemo.

Se sugiere un cuadro de registros (Cuadro B) que incluye para todas las fases del ciclo celular: la frecuencia del número de células, el índice de fases e índice mitótico en porcentajes y la duración en horas asumiendo un valor medio para un ciclo completo (en base a la curva de las mitosis obtenida en el Gráfico C).

Finalmente, para ilustrar los resultados con claridad, se propone un gráfico cuyas coordenadas representan la secuencia del ciclo celular e incluyen el total de horas registradas y los índices mitóticos en porcentajes (Gráfico C).

RESULTADOS

A manera de ejemplo se presentan los resultados de tres investigaciones en las que se determina el Índice mitótico y se estudia el Ciclo Celular en los géneros: *Zea*, *Phaseolus* y *Ullucus*.

Cuadro I. Evaluación de los Índices de Fases e Índices Mitóticos Parciales en 4 Especies del Género *Phaseolus*.

Hora	Células contadas	Interf. IF(%)	Prof. IF(%)	Metaf. IF(%)	Anaf. IF(%)	Telof. IF(%)	IM (%)
8:00	1200	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9:00	1200	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10:00	1200	72.77	14.99	3.05	3.22	5.97	27.23
11:00	1200	81.47	7.66	2.57	2.16	6.14	18.53
12:00	1200	88.95	8.60	1.10	0.87	0.48	11.05
13:00	1200	91.97	5.82	0.62	0.96	0.63	8.03
14:00	1200	93.24	4.92	0.26	0.92	0.66	6.76
15:00	1200	98.63	0.25	0.43	0.26	0.43	1.37
16:00	1200	96.95	0.00	1.38	0.32	1.35	3.05
17:00	1200	98.45	0.30	0.62	0.00	0.63	1.08
18:00	1200	96.94	0.35	1.28	0.35	1.08	3.06

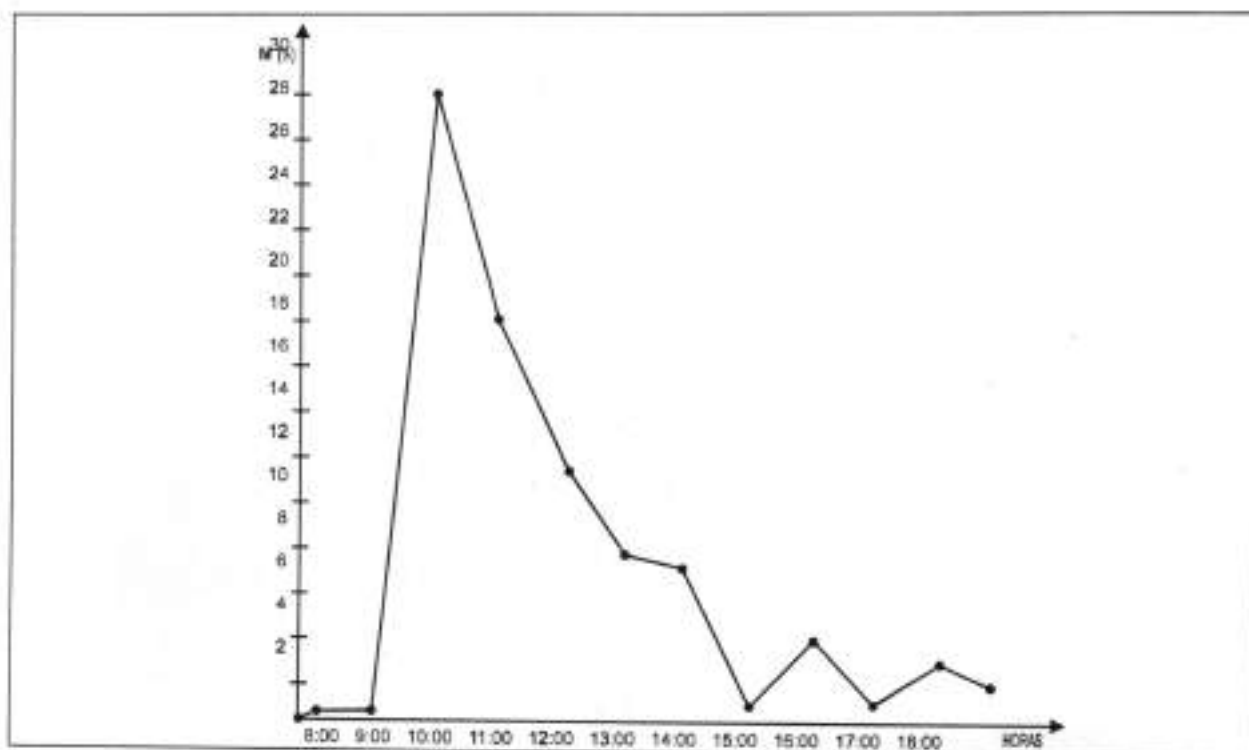


Gráfico 1. Secuencia del Ciclo Celular en 4 especies del Género Phaseolus.

Cuadro 2. Determinación de los IF e IM totales y de la duración del ciclo celular en 4 especies del género Phaseolus.

Estado	Total	Interf.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.
Frecuencia	13,200	12,232	515	136	109	208
IF (%)	100	92.66	3.90	1.03	0.83	1.58
IM (%)	7.34	(3.90 + 1.03 + 0.83 + 1.58)				
Duración Hrs asumiendo un valor medio para un ciclo completo = 10:00 Hrs	10.00	(9.27)	(0.39)	(0.10)	(0.08)	(0.16)
	10:00	9:16'	0:23"	0:06'	0:05'	0:10'

I. DURACION DEL CICLO CELULAR EN CELULAS DE MERISTEMO RADICULAR DE MAIZ.

Autor: Verma (1979).

La duración del ciclo celular en células de meristemo radicular de maíz es de 11:30 horas, la mayor parte de las cuales es ocupada por la interfase (10:00 - 10:50 horas), mientras que la mitosis tiene una duración de 1:34 horas. La duración de la interfase y mitosis en muestras de una serie poliploide ($2n= 2x, 3x, 4x$) de la línea autofecundante de maíz W23 se mantuvo sin variaciones (10:00, 1:30; 10:40, 1:10; 10:20, 1:30 horas, respectivamente). La duración del ciclo celular en líneas de diferentes genotipos presentó variaciones: 9:90 horas para la línea Seneca 60, 10:60 horas para KYS y el control, de 9:00 a 11:30 horas para la línea W23. La duración de la mitosis fué de 1:10, 1:12, 0:81 y 1:29 horas, respectivamente.

II. CARACTERIZACION CARIOTIPICA EN 4 ESPECIES DEL GENERO PHASEOLUS.

Autores: Talledo, Escobar (1995).

(Investigación financiada parcialmente por CONCYTEC, 93-94).

Muestras procedentes del Departamento de Ica (PERU), fueron proporcionadas por el Banco de Semillas del Instituto Nacional de Investigaciones para la Agricultura (INIA) filial de ICA. La temperatura durante el muestreo fue de 21°C, la humedad relativa, 81%.

En base a la evaluación del número de células en división y al número de células hijas producidas a partir de las primeras en un periodo de tiempo de 10 horas en 4 especies del género *Phaseolus*: *Ph. acutifolius* Gray. «Frijol ayocote», *Ph. aureus* L. «Frijol chino», *Ph. coccineus* L. «Frijol tepary» y *Ph. lunatus* L. «Pallar», fué

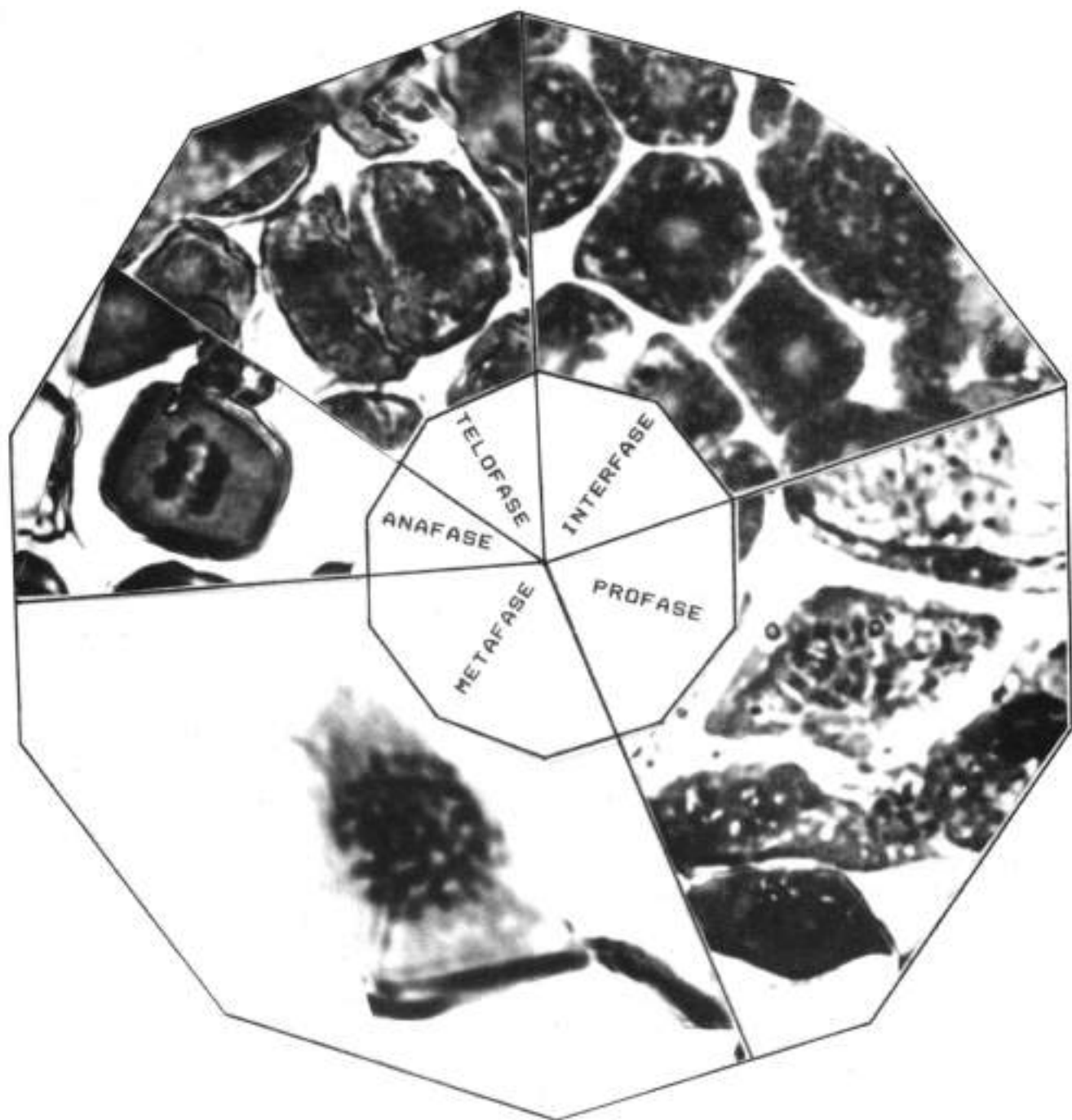


FOTO 2. El ciclo celular en Ullucus

Cuadro 3. Evaluación de los Índices de Fases e Índices Mitóticos Parciales en 10 accesiones de *Ollucus*.

Hora	Células contadas	Interf. IF(%)	Prof. IF(%)	Metaf. IF(%)	Anaf. IF(%)	Telof. IF(%)	IM (%)
9:40	1300	96.00	0.00	0.85	0.38	2.77	4.00
10:00	1300	96.77	0.85	1.38	0.69	0.31	3.23
10:30	600	92.77	1.67	2.67	3.00	0.00	7.24
11:00	600	96.67	0.50	0.50	0.17	2.17	3.34
11:30	900	96.22	0.00	0.00	0.00	3.78	3.78
12:00	350	88.57	0.00	0.29	0.29	10.85	11.43
13:00	1600	00.00	99.06	0.57	0.19	0.19	100.00
14:00	290	94.14	4.97	0.34	0.00	0.55	5.86
15:00	600	96.08	0.00	0.00	0.00	3.92	3.92
16:00	350	88.61	0.00	0.25	0.25	10.90	11.40

Cuadro 4. Determinación de los IF e IM totales y de la duración del ciclo celular en 10 accesiones de *Ollucus*.

Estado	Total	Interf.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.
Frecuencia	7,890	6,673	844	54	40	279
IF (%)	100	84.58	10.70	0.68	0.50	3.54
IM (%)	15.42	(10.70 + 0.68 + 0.50 + 3.54)				
Duración Hrs asumiendo un valor medio	6.20	(5.25)	(0.66)	(0.04)	(0.03)	(0.22)
para un ciclo completo = 6:20 Hrs	6:20	5:15	0:40'	0:02'30"	0:02'	0:13'

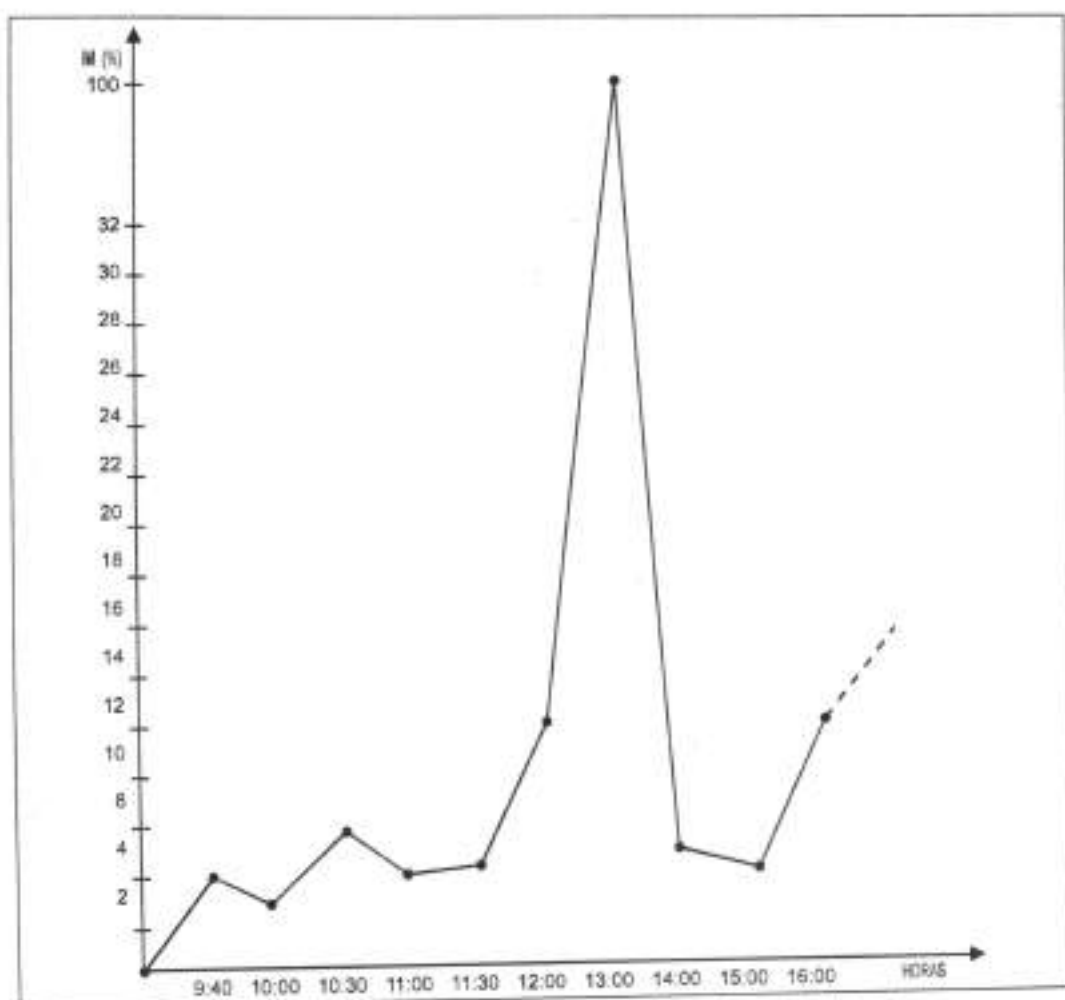


Gráfico 2. Secuencia del ciclo celular en 10 accesiones de Ullucus.

posible establecer que la mejor hora para la prefijación de las muestras con inhibidores mitóticos se encuentra comprendida entre las 10:00 am. y las 11:00 am. ya que se registran los mayores índices mitóticos ($I^M_{10:00} = 27.23\%$, $I^M_{11:00} = 18.53\%$) (Cuadro 1).

El ciclo mitótico presenta una duración aproximada de 44 minutos (Cuadro 2), iniciándose este a las 10:00 am. y finalizando aproximadamente a las 10:44 am. (Gráfico 1).

III. DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO Y DURACION DEL CICLO CELULAR EN ULLUCUS.

Autores: Talledo & Escobar (1994-1995).

Colaboradores: Espinoza, A.; Arenas, N.; Alzamora, H.; Hayano, C.

(Investigación financiada por COTESU - CIP).

Muestras procedentes del Departamento de Huánuco (PERU) fueron proporcionadas por el Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología (PRONARGEB - INIA). La temperatura durante el muestreo fue de 21°C, la humedad relativa 80-81%.

La evaluación del número de células en división y del número de células hijas producidas a partir de las primeras en un periodo de tiempo de 6:20 horas en 10 accesiones de

olluco (16, 27, 34, 37, 43, 45, 47, 59, 74 y 88) permitió establecer que la mejor hora para la prefijación de las muestras a 21°C y 80-81% H_r se encuentra entre las 12:00 pm. y las 13:00 horas ya que se registran los mayores índices mitóticos ($I^M_{12:00} = 11.43\%$, $I^M_{13:00} = 100.00\%$) (Foto 2, Cuadro 3).

El ciclo mitótico presenta una duración aproximada de 1:00 hora (Cuadro 4), iniciándose a las 12:00 pm. y finalizando a las 13:00 (Gráfico 2).

DISCUSION

I. El trabajo de VERMA (1979) citado en resultados (cit. de Shmaráyev *et al.* 1988) nos indica que el nivel de ploidía no influyó sobre la duración del ciclo celular, mientras que las líneas de diferentes genotipos sí se diferenciaban entre sí para estos parámetros, lo que refleja el condicionamiento genético de la duración del ciclo celular. Al respecto, es interesante señalar que para el maíz se han identificado más de 15 genes que actúan sobre este proceso (Shmaráyev *et al.*; 1988) (Ver Anexo).

En especies de los géneros *Lycopersicon*, *Solanum* y otros también se han identificado grupos de genes que

ANEXO UNICO: Control Genético de la División Celular en *Zea mays* (Tomado de Shmarajev et. al., 1988)

Símb./Nombre Gen.	Cromosomas	Locus	Fenotipo
afd1-Absence of first div.	—	—	Ausencia de la primera división de la meiosis. Esterilidad.
am1 - Ameiotic.	5S	20	Incapacidad para iniciar la meiosis. Tejidos esporogénicos degeneran. Esterilidad.
as1-Asynaptic.	1S	56	Ausencia de sinapsis de cromos. homólogos en la profase meiótica. Esterilidad parcial.
dsy1-Desynaptic.	—	—	Desinapsis de los cromos. homólogos. Total esterilidad σ , parcial esterilidad φ .
dsy2- -n-	—	—	Idem.
dv1-Divergent spindle	—	—	Huso divergente; sus filamentos se separan en los polos en meiosis I en T1 se forman micronucleos.
dy1-Desynaptic	—	—	Cromos. son incapaces de conjugarse en los microsporocitos
ell-elongate	—	—	Los cromos. se desespiralizan y elongan en metafase y anafase meiótica: formación de óvulos sin reducir y óvulos haploides.
K10-Abnormal -chrom. 10	10L	Cerca de sr2	Engrosamiento heterocromático al extremo del brazo largo del cromos. 10. La actividad neocéntrica altera la segregación normal.
ms4-male sterile (=pol)	6S	0	Esterilidad σ : mitosis post-meiótica prematura, sin replicación, anormal microsporogénesis.
ms28- -n-	—	—	Bloqueo parcial o total de citocinesis.
ms43- -n-	8	—	Formación de polen plurinucleado.
pam1 - Plural abnormalities of meiosis.	—	—	Múltiples anomalías inespecíficas antes y durante la meiosis.
pam2 - -n-	—	—	Idem a pam1
pol- Polymitotic.	6S	0	Formación de núcleos heterogéneos en microsporas.
st1-Sticky chrom.	4S	62	Cromos. «pegados» en la meiosis. Esterilidad parcial.

controlan los procesos de división celular (Rick, 1971; Zhuchenko, 1973; Ramanna, 1979) lo que sugiere que el control poligénico de la mitosis y la meiosis es universal.

II. En un estudio del Índice de fases e índice mitótico a una temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) los autores (Talledo & Escobar, 1995) encontramos que el ciclo mitótico para las 4 especies estudiadas del género *Phaseolus* tuvo una duración aproximada de 44 minutos.

Comparando estos resultados con los de Arenas N. y Hayano C. (1994), quienes registraron los índices mitóticos para dos de estas especies (*Ph. aureus* y *Ph. lunatus*) a temperaturas superiores a los 22°C y determinaron que el ciclo celular en *Ph. aureus* fue de 2:30 horas y en *Ph. lunatus* de 2:00 horas, encontramos que la temperatura influye directamente sobre la duración del ciclo celular en las especies de este género.

III. La clasificación sistemática de *Ullucus*, que enfoca las accesiones de *Ullucus tuberosum* como pertenecientes a una misma especie, indujo a los autores del presente trabajo a evaluar el Índice mitótico a partir de 10 accesiones de olluco obteniendo los resultados presentados en los Cuadros N°3 y N°4. Sin embargo, al evaluar en forma discriminada 02 accesiones de *Lepidium meyenii* «Maca» (Crema y Crema-morada) procedentes del Departamento de Junín - PERU) hemos encontrado que entre éstas se presentan diferencias significativas, tanto en lo que se refiere al tamaño de las células como a su volumen nuclear.

Estos resultados estarían indicando que las respuestas de estos 2 genotipos a un mismo tratamiento citológico difieren no sólo en lo que se refiere a la duración del ciclo celular, sino también en cuanto a caracteres cariomorfológicos. Corresponde a nuestros taxónomos determinar si estos criterios pueden ser suficientes para delimitar con mayor claridad la sistemática de este género.

Para ello debemos tener en cuenta que cuando enfocamos la especie como un sistema de formas debemos conocer todo el sistema de variabilidad (la amplitud de la variabilidad genética de los diferentes caracteres). Los datos obtenidos experimentalmente sobre variabilidad genética inducida van a complicar aún más la serie de caracteres propias de las especies linneanas, evidenciando un complejo sistema de genotipos de las mismas y su potencialidad en el sentido de la diversificación específica. Los caracteres morfofisiológicos sólo nos introducen hacia la comprensión de los genotipos, para un juicio concluyente sobre la naturaleza genética de las formas se precisa del experimento (Vavilov, 1987). Es más, sabemos que la uniformidad externa no refleja lo suficiente la composición genética de la especie o variedad, el establecimiento del sistema de la especie en el sentido de una serie completa de formas posibles puede precisarse de la experiencia analítica y sintética del genetista. La sistemática moderna necesita de un enfoque genético para la comprensión de la especie (Vavilov, 1987).

Villiers (1979) señala que las diversas modificaciones estructurales de las especies son producidas por la información codificada en el genoma cuya actividad puede estar condicionada por un programa autónomo por señales ambientales.

Es necesario considerar qué factores ambientales, además de la luz, la temperatura y la duración del día, estarían desempeñando el rol de señales ambientales.

CONCLUSIONES.

1. El nivel de ploidía no influye sobre la duración del ciclo celular; sin embargo, las líneas de diferentes genotipos se diferencian entre sí para estos parámetros.
2. El desarrollo del ciclo celular está regulado por grupos de genes que controlan las fases que lo constituyen y por la acción de factores ambientales.
3. La acción de señales ambientales como la luz, la temperatura, etc., puede influir sobre las variaciones de la duración del ciclo celular y de las peculiaridades estructurales de las especies debido a su condicionamiento genético.
4. Esta información se codifica en el genoma, por lo que presentan especial importancia tanto los factores que actúan sobre el mismo como los que influyen sobre la capacidad de transcripción de dicha información.
5. Los grupos de organismos que se desarrollan en condiciones de aislamiento en hábitats que presentan diferentes variaciones ambientales, como es el caso de las especies que se desarrollan en la Zona Andina, se encuentran especialmente expuestos a dichos factores.
6. Los tratamientos propios de la reproducción y conservación por cultivos *in vitro* pueden estar modelando este proceso en forma parcial.
7. Este modelamiento explicaría la variación somaclonal registrada en algunos casos.
8. Los estudios de la morfología cromosómica nos brindan información sobre el grado de «empaquetamiento» de la información genética y, a través de ello, de su capacidad de transcripción.
9. El condicionamiento genético del ciclo celular y su capacidad de respuesta ante la acción de los factores ambientales pueden esclarecer el rol de la poliploidía en el proceso de diversificación específica de las raíces y tuberosas andinas, así como los mecanismos de formación de poliploides.
10. Es importante desarrollar estudios del ciclo celular y de la morfología cromosómica en especies de raíces y tuberosas andinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos expresar nuestro reconocimiento al Programa Colaborativo COTESU-CIP, al

CONCYTEC y a la Universidad Ricardo Palma, Rectorado, Facultad de Ciencias Biológicas y Departamento Académico de Ciencias, sin cuyo apoyo no hubiera sido posible desarrollar el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AL-BADER, A.A.; ORENGO, A.; RAO, P.N. 1978. G₂ phase-specific proteins of HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75: 6064-6068.
- ARENAS, N.; HAYANO, A. 1994. Estudio del ciclo celular en las especies *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus aureus*. Lima, Perú. Libro de Resúmenes del 6° Congreso de Jóvenes Científicos (Marzo de 1994).
- BARLOW, P.W. 1977. An experimental study of cell and nuclear growth and their relation to cell diversification within a plant tissue. *Differentiation.* 8: 153-157.
- BARLOW, P.W. 1978. The interrelationship of the cycles of chromosome condensation and reduplication in cell growth processes. *Nucleus.* 21: 1-18.
- BENNETT, M.D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. Roy. Soc. London B.* 181: 109-135.
- BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T.; ZAKHARYEVA, O. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad. *Nauka.* 926 pp.
- BRODSKY, V.Y.; URIVAYEVA, I.V. 1977. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Intern. Rev. Cytol.* 50: 275-332.
- BRODSKY, V.Y.; URIVAYEVA, I.V. 1981. (Poliploidía celular, Proliferación y diferenciación). Ed. Nauka, Moscú. (En ruso).
- BROOKS, R.F. 1977. Continuous protein synthesis is required to maintain the probability of entry into S phase. *Cell.* 12: 311-317.
- BRUNORI, A. 1971. Synthesis of DNA and mitosis in relation to cell differentiation in the roots of *Vicia faba* and *Latuca sativa*. *Caryologia.* 24: 209-215.
- CÁRDENAS, M., HAWKES, J.G. 1948. Número de cromosomas de algunas plantas nativas cultivadas por los indios en los Andes. Cochabamba, Bolivia. *Rev. Agricultura* 5: 30 - 32.
- D'AMATO, F. 1977. Nuclear cytology in relation to the development. Cambridge: Univ. Press.
- DEL CAMPO, A., 1988. Biología del Ciclo de División celular. Maracaibo, Venezuela. Univ. de Zulia, Fac. Experimental de Ciencias. 151 pp.
- ESCOBAR, C. 1991. Estudio cariotípico comparativo en cuatro especies del género *Phaseolus*: *Ph. acutifolius* Gray «Frijol tépary», *Ph. coccineus* L. «Frijol ayocote», *Ph. lunatus* L. «Pallar» y *Ph. vulgaris* L. «Frijol común». Tes. Lic. Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 85 pp.
- EPIFÁNOVA, O.I. 1973. *Estudio de los mecanismos de regulación del ciclo celular por medio de inhibidores de la transcripción y la translación.* En: El ciclo celular). Ed. Nauka, Moscú. PP. 72-103. (En ruso).
- FOARD, D.E. 1970. *Differentiation in Plant Cells.* In: Molecular and Structural Differentiation of Cells.
- GROSSET, L.; ODARTCHENKO, N. 1975a. Relationships between cell cycle duration, S-period and nuclear DNA content in erythroblasts of four vertebrate species. *Cell and Tissue Kinet.* 8: 81-90.
- GROSSET, L.; ODARTCHENKO, N. 1975b. Duration of mitosis and separate mitotic phases compared to nuclear DNA content in erythroblasts of four vertebrate species. *Cell and Tissue Kinet.* 8: 91-96.
- HERVAS, J.P. 1975. Mitotic activity of endopolyploid root cells in *Allium cepa*. *Experientia.* 31: 1143-1144.
- IVANOV, V.B. 1974. (Bases celulares del crecimiento en vegetales). Ed. Nauka, Moscú. 254 pp. (En ruso).
- IVANOV, V.B. 1978. (Contenido de ADN nuclear y velocidad de desarrollo de las plantas). *Ontogenes.* T. 9. PP. 39-53.
- JARDÍN BOTANICO DE CORDOVA (España). 1992. Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción Agrícola y protección vegetal. N° 26. 339 p.
- JESIN, Y.E. 1967. (Tamaño nuclear y estado funcional de las células). Ed. Medicina, Moscú. 225 pp. (En ruso).
- LARKKA, J., JOKELA, P., PIETILA, L., VIINIKKA, Y. 1992. Karyotypes and meiosis of cultivated and wild ulluco. *Caryologia.* 45: 229-235.
- LASSELAIN, M.J. PAREYRE, C.; DEYSSON, G. 1978. Contribution to the understanding of the mechanism of cytokinesis in plant cells: the action of deoxiguanosine on the kinetics of a root meristem cell population. *Cell and Tiss. Kinet.* 11: 519-527.
- LIBBENGA, K.R.; TORREY, J.G. 1973. Hormone induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Amer. J. Bot.* 60: 293-299.
- LIN, M.S.; WALDEN, D.B. 1974. Endoreduplication induced by hydroxylamine sulfate in *Zea mais* root tip nuclei. *Exp. Cell. Res.* 86: 47-52.

- MATTHYSSE, A.; TORREY, I. 1967. DNA synthesis in relation to polyploid mitosis in excised pea root segments cultured in vitro. *Exp. Cell. Res.* 48: 484-499.
- MEYER, J.R. 1945. Prefixing with paradichloro-benzene to facilitate chromosome study. *Stain Technol.* 20: 121-125.
- MEZIA, D. 1963. (La mitosis y la fisiología de la división celular). Ed. Mir, Moscú. 345 pp. (En ruso).
- MOLINA, M. DEL C.; NARANJO, C.A. 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidences for five as the basic chromosome number. *Theor. Appl. Genet.* 73: 542-500.
- MORRISON, J.W. 1953. Chromosome behaviour in wheat monosomics. *Heredity.* 7: 203-217.
- NAGL, W. 1970. Differential inhibition by actinomycin D and histone F₁ of mitosis and endomitosis in *Allium carinatum*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 63: 316-326.
- NAGL, W. 1978. Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. Amsterdam: North-Holland.
- NAGL, W.; PESCHKE, C.; VANGYSEGHEM, R. 1976. Heterochromatin underreduplication in *Tropaeolum* embryogenesis. *Naturwissenschaften. Bd.* 63: 198-199.
- National Research Council, 1989. Lost crops of the Incas: Little-Known plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press, Washington, D.C. 415 pp.
- NUTI RONCHI, V.; AVANZI, S.; D'AMATO, F. 1965. Chromosome endoreduplication (endopolyploidy) in *Pea* root meristems induced by 8-azaguanine. *Caryologia.* 18: 599-617.
- O'MARA, J.G. 1939. Observations of the immediate effects of colchicine. *J. Herd.* 30: 35-37.
- PIJNACKER, L.P.; SREERAMULU, K.; DIJKHUIS, P.; FERWERDA, M. 1989. Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 77: 102-110.
- PRESCOTT, D.M. 1976. Reproduction of eukaryotic cells. N.Y.; L. Acad. Press.
- PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA, A. 1959. (Interacciones del núcleo y el citoplasma en células de almacenamiento de almidón en papa). *Citología.* T. 1. PP. 257-269. (En ruso).
- PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA, A.A. 1960. (*Ciclo nuclear y diferenciación de las células somáticas*. En: Problemas de la Citología y la Fisiología General). Ed. Ac. de CC. de la URSS, Moscú, Leningrado. PP. 215-253. (En ruso).
- PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA, A.A. 1986. (Regiones heterocromáticas de los cromosomas). Ed. Nauka, Moscú. 431 pp. (En ruso).
- RAMANNA, M.S. 1979. A re-examination of the mechanisms of 2n-gamete formation in potato and its implication for breeding. *Euphytica.* 28: 537-561.
- RAO, P.N.; WILSON, B.A.; SUNKARA, P. 1978. Inducers of DNA synthesis present during mitosis of mammalian cells lacking G₁ and G₂ phases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75: 5043-5047.
- RICK, C.M. 1971. Some Cytogenetic Features of the Genome in Diploid Plant Species. Strabler Symp., 1,2.
- SHIOMI, T.; SATO, A. 1978. Cell cycle studies in a temperature-sensitive cell division mutant of mammalian cells. *Cell. Struct. and Funct.* 3: 95-102.
- SHMARAYEV, G. E.; PODOLSKAYA, A.P.; GOLUBOVSKAYA, I.N. 1988. (*Genética del maíz*. En: Genética de las plantas cultivadas). Leningrado, Agropromizdat. PP. 6-67. (En ruso).
- SINNOTT, E.W. 1960. Plant morphogenesis. N.Y.: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- SMIRNOV, V.G. 1991. (Citogenética). Ed. Vysshaya shkola. Moscú. 247 pp.
- SMITH, B.J.; WIGGLESWORTH, N.M. 1972. A cell line which is temperature-sensitive for cytokinesis. *J. Cell. Physiol.* 80: 253-258.
- STEPHEN, I. 1973. Occurrence of polyteny, endopolyploidy and numerical variation of nucleoli in maize endosperm. *Sci. and Cult.* 37: 323-324.
- STEPHEN, I. 1974. Cytological investigation on the endosperm of *Borassus flabellifer*. *Cytologia.* 39: 195-207.
- TALLEDO, D. 1991. (Estudio cariotípico comparativo de 9 especies del género *Solanum* L. utilizadas en el Fitomejoramiento como donantes de caracteres de importancia económica). Tesis Diss. Ph. D. in Biology. Moscú. 152 pp. (En ruso).
- TALLEDO, D.; ESCOBAR, C., 1995. Caracterización cariotípica en 4 especies del género *Phaseolus*. Lima, Universidad Ricardo Palma. Inf. científico. 55 p.
- TALLEDO, D.; ESCOBAR, C.; ALLEMAN, V. 1993. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima, Universidad Ricardo Palma. 141 pp.
- TJIO, J.M.; LEVAN, A. 1950. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *An. Estac. Exp. Aula Del.* 2, 21.

- TJIO, J.H.; LEVAN A. 1954. Some experiences with acetic-orcein. *An. Estac. Exp. Aula Dei.* 3: 225-228.
- VAN PARIJS, R.; VANDENDRIESSCHE, L. 1966. Changes in the DNA content of nuclei during the process of cell elongation in plants. I. Formation of polytene chromosomes. *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* 74: 579-586.
- VAN'T HOFF, J. 1973. The regulation of the cell division in higher plants. From: *Basic Mechanisms in Plant Morphogenesis*. Brookhaven Symposium. PP. 152-165.
- VAN'T HOFF, J.; SPARROW, A.M. 1963. A relationship between DNA content, nuclear volume and minimum mitotic cycle time. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 49: 897-902.
- VAVÍLOV, N.I. 1987. (*Métodos para identificar los Centros de Origen de las plantas. En: Origen y geografía de las plantas cultivadas*). Leningrado, Nauka. PP. 32-45. (En ruso).
- VILLIERS, T.A. 1979. *Reposo y supervivencia de las plantas*. Barcelona, Ed. Omega. 77 p.
- WANG, R.I. 1974. Temperature-sensitive mammalian cell line blocked in mitosis. *Nature.* 248:76-78.
- WANG, R.I. 1976. A novel temperature-sensitive mammalian cell line exhibiting defective prophase progression. *Cell.* 8: 257-261.
- WISSINGER, W.; WANG, R.I. 1978. A temperature-sensitive cell line defective in post-metaphase chromosome movement. *Exp. Cell Res.* 112: 89-94.
- ZHUCHENKO, A.A. 1973. *Caracterización citogenética. En: (Genética de los tomates)*. Kishiñov (Moldavia), Shtiintza. PP. 82-156. (en ruso)