

**ACCION GENICA Y MORFOGENESIS
EN LAS PLANTAS SUPERIORES**

G. LEDYARD STEBBINS

**DEPARTAMENTO OF GENETICS, UNIVERSITY OF CALIFORNIA.
DAVIS, CALIFORNIA, U. S. A.**

ACCION GENICA Y MORFOGENESIS EN LAS PLANTAS SUPERIORES *

G. LEDYARD STEBBINS

Departament of Genetics, University of California.
Davis, California, U. S. A.

INTRODUCCION

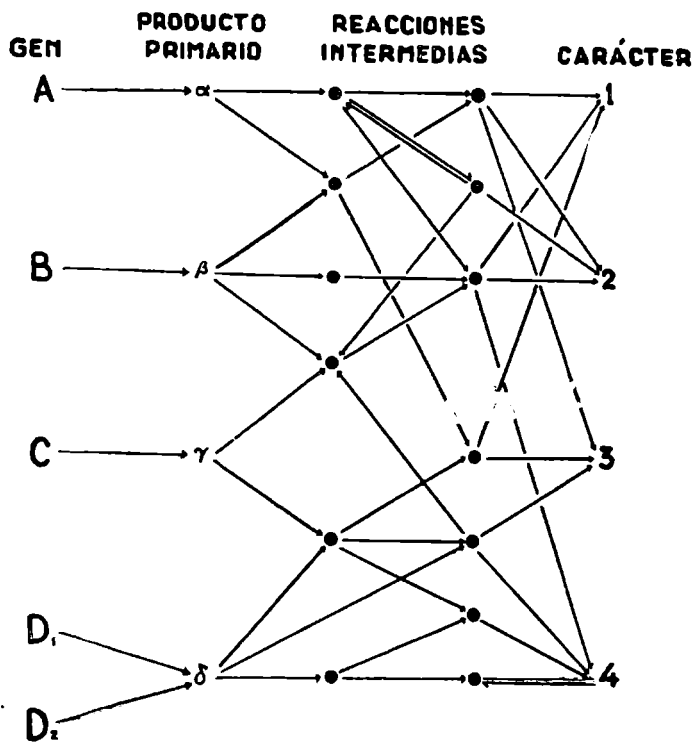
Para un estudio de la evolución de las plantas, el más importante de los problemas botánicos no resueltos es, al presente, la manera en que la acción primaria de los genes, que es de naturaleza química, puede traducirse en las características de la forma exterior por la cual distinguimos a las plantas y determinamos las relaciones evolutivas entre ellas. La importancia de este problema para una comprensión de la evolución de las plantas, reside en el hecho de que la selección natural, que guía el curso de la evolución, debe escoger individuos, poblaciones y líneas evolutivas, sobre la base de la adaptabilidad de sus características totalmente formadas, o fenotipos, mientras que la transformación de las poblaciones en la evolución depende de que en ellas se establezcan genotipos alterados, los cuales, mediante una secuencia complicada de sucesos, darán origen a las alteraciones adaptativas requeridas en el fenotipo. Debido a la complejidad del desarrollo podemos estar seguros de que la acción de la selección sobre el genotipo es indirecta, y de que ciertamente debe originar muchos cambios fenotípicos que no son respuestas directas a la presión de selección particular que está operando. Sin embargo, la cantidad y naturaleza de estos efectos indirectos no se conocerán mientras no comprendamos mejor la acción en el desarrollo de aquellos genes responsables de las diferencias adaptativas, tanto de aquellos que afectan características morfológicas visibles de la planta como de aquellos que alteran sus reacciones fisiológicas sin efectos visibles evidentes.

Los primeros hechos que atestiguan sobre la complejidad de la secuencia de sucesos que separan la acción génica inicial de la expresión final de los caracteres, son aquellos de la pleiotropía y de la herencia multifactorial. Es bien conocido el hecho de que las diferencias entre poblaciones naturales con respecto a características tales como tamaño, precocidad de floración, forma de hojas, pé-

* Conferencia pronunciada por el Dr. LEDYARD STEBBINS, en ocasión de las "Sextas Jornadas Argentinas de Botánica", realizadas por la Sociedad Argentina de Botánica en la Universidad Nacional de La Plata, y a las cuales asistiera especialmente invitado por la Comisión de Investigación Científica de la provincia de Buenos Aires.

talos y otros órganos, están gobernados por muchos genes ubicados en numerosos *loci* diferentes a lo largo de los cromosomas. El trabajo reciente de Clausen y Hiesey (1958) sobre la herencia de diferencias entre un ecotipo costero subtropical y un ecotipo subalpino, de la especie californiana *Potentilla glandulosa*, ilustra este hecho parti-

EL CONCEPTO DEL "CIRCUITO ELECTRÓNICO DE LA ACCIÓN GÉNICA"



cularmente bien. De las 19 diferencias en caracteres que estudiaron en estos ecotipos, encontraron que 12 eran gobernadas por un número grade indefinido de *loci* génicos, 4 por tres *loci*, y 3 por uno o dos *loci* principales más modificadores. Ninguna de las características que estudiaron exhibió herencia mendeliana simple que indicara diferencias con respecto a un solo gen.

Aunque no tan extensa, la evidencia de la acción génica pleiotrópica es no obstante abundante. Un buen ejemplo es el gen "petioled" (peciulado) en *Nicotiana tabacum*, que he discutido en otro lugar (Stebbins 1950-1959). Este gen altera de una manera semejante las hojas, sépalos, lóbulos del cáliz, lóbulos de la corola, anteras y cápsula. Cada una de estas estructuras es más fina y más aguzada en el ápice en el genotipo "peciulado" que en los apéndices corres-

pondientes a plantas no pecioladas. Los estudios preliminares de los primordios jóvenes de los apéndices, sugieren que el efecto es producido por una mayor cantidad de elongación celular en el desarrollo temprano, con relación a la división celular, pero esto debe verificarse mediante análisis más cuidadosos.

La preponderancia de la pleiotropía y la herencia multifactorial con respecto a las características adaptativas de las plantas superiores requiere que expresemos la acción génica en ellas por un diagrama similar a aquel de la Figura 1, el cual expresa lo que, por sugestión de mi colega Dr. Richard Snow, debiera llamarse el concepto del "circuito electrónico" de la acción génica. Si un gen determina la naturaleza de una reacción bioquímica primaria del metabolismo celular, es probable que esta reacción ocurra en muchas células diferentes en distintos estados del desarrollo. De muchas maneras, los efectos de esta reacción serán similares dondequiera que ella ocurra, pero las diferencias en el ambiente intracelular y en la naturaleza de otras reacciones que ocurran simultáneamente, causarán ciertamente que una sola reacción primaria produzca resultados finales diferentes en partes diferentes de la planta. Esta es la base más probable de la acción génica pleiotrópica. La herencia multifactorial se basa probablemente sobre el hecho de que la forma y estructura de cualquier órgano es el resultado de la interacción, durante el desarrollo, de muchos genes diferentes que tienen diversos efectos primarios. En consecuencia, una nueva forma o condición de una estructura, adaptativas, sólo pueden producirse si se cambia de un modo armonioso la acción de muchos genes diferentes.

Debido al gran número de reacciones químicas controladas génicamente, que incluye el problema general de la manera cómo los genes producen los caracteres visibles, es un problema compuesto que contiene muchos problemas más pequeños. En consecuencia, antes de abordar experimentalmente el problema general, debemos analizarlo y resolverlo en las unidades específicas de las cuales está compuesto. Un primer intento de tal análisis se presenta en la Fig. 2, que representa en términos generales los tipos principales de procesos que median entre el gen y el carácter. Pueden reconocerse tres tipos generales de reacciones. En primer lugar está la acción primaria del ácido desoxirribonucleico génico, que produce ácido ribonucleico y proteínas, incluyendo enzimas. Luego vienen las interacciones entre reacciones químicas controladas enzimáticamente, que ocurren dentro de las células y que son responsables de su crecimiento, división y diferenciación. Vienen finalmente las relaciones entre grupos de células que, por su división, elongación y diferenciación, producen tejidos y órganos. Estas etapas están estrechamente conectadas entre sí, de una manera especial. Los distintos estados del desarrollo forman una secuencia epigenética en la cual el substrato, y por eso la velocidad de cada proceso químico que ocurra en

ETAPAS PRINCIPALES
EN LA TRAYECTORIA DESDE EL GEN HASTA EL CARÁCTER
DE LA FORMA EN LAS PLANTAS SUPERIORES

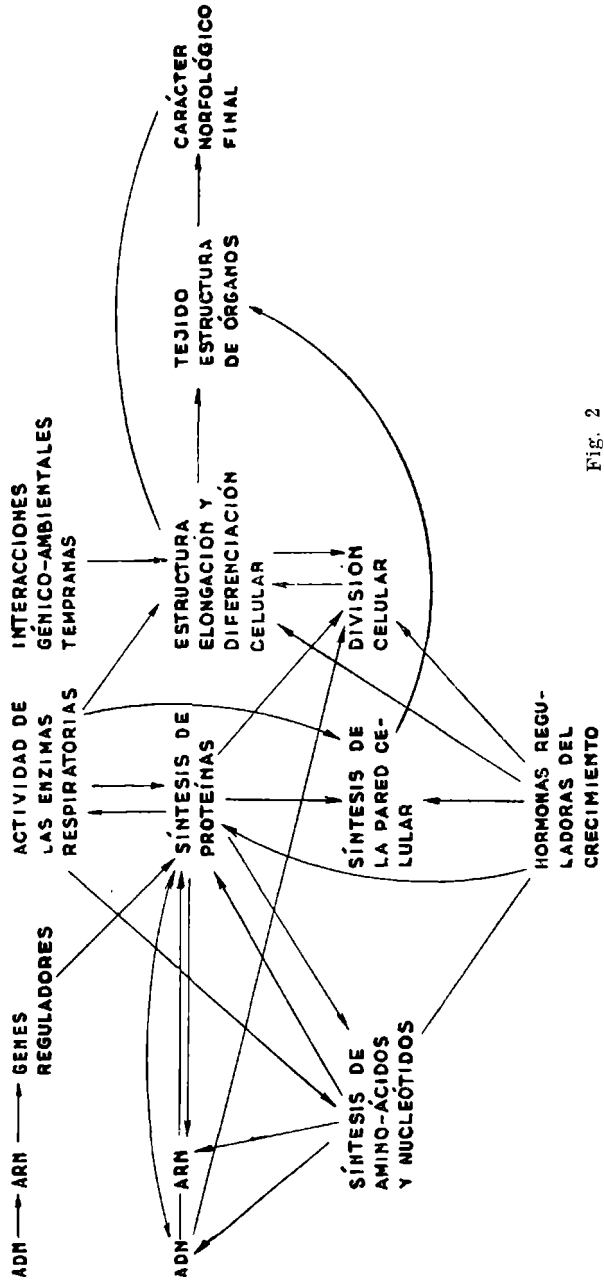


Fig. 2

un estado posterior, dependen de otros procesos químicos que ocurrieron en un estado anterior de dicho desarrollo. En consecuencia, el análisis de esta secuencia epigenética exige una comprensión tanto de los propios procesos separados como de las maneras en que interaccionan entre sí los diferentes procesos.

ACCION GENICA PRIMARIA

Durante el año pasado se han producido adelantos espectaculares en nuestro conocimiento de la acción génica primaria. Estos hechos están ahora establecidos firmemente. Los genes consisten principalmente en ácido desoxirribonucleico, y sólo contienen cuatro clases de nucleótidos, dispuestos en pares, adenina-timina y citosina-guanina. La especificidad génica resulta del hecho de que estos pares de bases de los nucleótidos están ligados entre sí en largos filamentos espiralizados, en la molécula génica, y de que cada gen tiene un patrón de disposición particular y lineal de los pares de bases, en su filamento espiralizado. Este patrón contiene la "información" que dirige la síntesis de amino-ácidos individuales, así como el orden de los amino-ácidos en la cadena de polipéptidos de la molécula de proteína. En consecuencia, la especificidad génica determina la especificidad de la proteína, porque el patrón lineal de disposición de los nucleótidos en la molécula génica determina eventualmente el patrón de la disposición de los amino-ácidos en la molécula de proteína. La substancia intermediaria en esta secuencia de reacciones, es el ácido ribonucleico, que lleva la información desde el ácido desoxirribonucleico hasta las proteínas.

El descubrimiento de que disposiciones específicas de nucleótidos, en grupos de tres, proveen el "código" para los amino-ácidos individuales, es quizá de tanta significación para nuestra comprensión de la biología genética y evolutiva, como el descubrimiento de la tabla periódica de los elementos lo fue para la física y la química. Pero así como la química orgánica sólo usa una parte de la tabla periódica, y sobre ella construye una superestructura enorme de información, relativa a la síntesis y propiedades de los compuestos orgánicos, de la misma manera es probable que la biología del desarrollo de los organismos superiores será capaz de usar el código básico solamente como un fundamento inicial, y será requerido para construir sobre él una superestructura voluminosa de información bioquímica relativa a la naturaleza e interacción de procesos de desarrollo controlados enzimáticamente.

REGULACION DE LA ACCION GENICA

Un descubrimiento sobre acción génica en bacterias, que es de profunda significación para los estudiosos de las plantas superiores, es la identificación, por Jacob y Monod (1961), de genes que regulan la actividad de otros genes. En el sistema que estudiaron en *Escherichia coli*, un gen específico, el operador, controla la activación de un "gen estructural" particular ubicado al lado suyo, poseyendo el último la información codificada para la estructura de una proteína

particular. Un segundo elemento, el regulador, que puede estar ubicado en cualquier posición a lo largo del cromosoma, produce una substancia citoplasmática que afecta la rapidez a la cual el operador activa al gen estructural. Mc Clintock (1961) ha señalado que este sistema complejo de regulación es muy similar al que ella ha estado estudiando por muchos años en maíz y que ha llamado el sistema activador-disociador. El reconocimiento de sistemas similares en organismos tan diferentes como el colibacilo y el maíz, sugiere que pueden encontrarse en la mayoría, si no en todos, los sistemas vivos.

Sin embargo, debemos reconocer la posibilidad de que, en los animales y plantas superiores, la acción génica puede estar regulada por sistemas que no existen en las bacterias. En relación con esto, un orgánulo que debiera considerarse seriamente es el nucléolo. Los nucléolos se encuentran en las células de todos los organismos que poseen una membrana nuclear definida, desde organismos unicelulares como *Chlamydomonas* y *Euglena*, hasta animales y plantas superiores. Investigaciones recientes han demostrado que su función está asociada indudablemente con el metabolismo del ácido ribonucleico (Brachet, 1960), aunque no se comprende su naturaleza exacta. Si los nucléolos son destruidos por una microrradiación mientras que los contenidos nucleares remanentes no son dañados (Perry, comunicación oral) el pasaje de ácido ribonucleico desde el núcleo al citoplasma es anulado e inhibida la síntesis de proteína. Citidina radioactiva (tritiada), introducida en la célula, es detectada primero como ácido ribonucleico en el nucléolo, y luego penetra el citoplasma en los ribosomas (Woods, 1959). Heslop-Harrison (1960) ha encontrado recientemente que si meristemas de plantas son tratados con una substancia química análoga de un componente del ácido ribonucleico, 2-tiouracilo, se inhibe la formación de las células foliares. Esto está asociado con el fracaso de los ribosomas en pasar desde el nucléolo hasta el citoplasma (Heslop-Harrison, *in litt.*). El Dr. James Bonner y sus colegas han encontrado que en núcleos aislados de arveja, la síntesis del ácido ribonucleico ocurre a todo lo largo de los cromosomas, pero que luego de formarse deja los cromosomas y se deposita en el nucléolo. En las células muy grandes de *Acetabularia* (Werz, 1961), el crecimiento y la diferenciación están asociados con tamaño grande y forma irregular del nucléolo.

Todos estos datos experimentales, obtenidos por distintos investigadores en organismos diferentes, tendrían sentido si se supone que el nucléolo es un órgano regulador que controla la intensidad de la síntesis de proteína, por acumulación del ácido ribonucleico que es sintetizado más o menos continuamente por el ácido desoxirribonucleico, y por despacharlo hacia el citoplasma en forma de ribosomas, con una rapidez que está determinada por el ambiente físico-químico inmediato de la célula. Desde que las proteínas son sintetizadas sobre la superficie de los ribosomas, el número de estos cuerpos presentes en una célula podría ser en muchos casos un factor limitante de la síntesis de proteína.

Esta hipótesis, que es francamente especulativa, se adelanta para recalcar la necesidad de más estudios de los nucléolos y su actividad, particularmente en relación con el rol del ácido ribonucleico en el desarrollo.

COMPORTAMIENTO CELULAR Y FORMA DE LOS ORGANOS

La exploración adicional de la acción génica, en relación con la forma y estructura de los organismos superiores, se hace altamente especulativa, debido a nuestra falta de conocimiento. En consecuencia, dedicaré el resto de esta disertación a la investigación que hemos estado conduciendo en un esfuerzo para aislar aquellos problemas que deben solucionarse antes de que podamos explicar la forma adulta sobre la base del comportamiento celular. Comenzaré con un análisis parcial de una diferencia monogénica en cebada, que se ha seleccionado debido a su efecto profundo sobre la estructura de un órgano particular, la gluma fértil o lemma. El gen *hooded* (encapuchado) (KK) es conocida desde hace más de cien años como el rasgo distintivo de una variedad de cebada que fue descubierta originalmente en los montes Himalaya del Nepal. Los primeros estudiosos de la genética de la cebada lo identificaron como un gen dominante simple, y mi colega, Mr. Coit Suneson, lo ha transferido, por retrocruzamiento, al patrimonio genético de una variedad de primavera de seis hileras, ampliamente cultivada, conocida como Atlas.

En este patrimonio, el gen *hooded* no ejerce efectos detectables sobre caracteres vegetativos o sobre cualesquiera estructuras florales, excepto la gluma fértil o lemma. La mitad superior de esta estructura es modificada profundamente. La arista larga y fina, que alcanza una longitud de quince centímetros en el genotipo de Atlas aristado normal (kk), es reemplazada por una estructura compleja conocida como la capucha (Fig. 3). La disección revela que la capucha contiene dos espiguillas rudimentarias extras, conectadas entre sí por una raquilla que se extiende más allá de la palea normal, en todas las variedades de cebada. La más inferior de estas dos espiguillas está invertida y su palea, anteras rudimentarias y ovario rudimentario, están dirigidos hacia la base de la lemma. Dos apéndices laterales están ubicados entre esta espiguilla y la mitad inferior de la lemma, que en todo respecto es normal y comparable a la porción basal de la lemma en el genotipo aristado. Estos apéndices laterales están a menudo prolongados en estructuras aristiformes, y se interpretan mejor como homólogos de las aristas de la espiguilla principal y de la espiguilla rudimentaria inferior. No se puede evitar la conclusión de que la lemma encapuchada consiste realmente en una porción aislada de un eje, inserta sobre la región apical de un apéndice floral, la lemma. En consecuencia, toda la estructura es anómala y completamente diferente de cualquier otra estructura conocida, sea en las Gramíneas o en cualquier otra monocotiledónea. Si podemos descubrir cómo puede un gen producir tal efecto profundo sobre un solo tipo de estructura, sin afectar visiblemente el

resto de la planta, habremos aprendido mucho sobre la manera en que los genes pueden producir diferencias en la forma externa.

Cuando analizamos los estados más tempranos del desarrollo de la lemma, no encontramos diferencias detectables entre "encapuchado" y "aristado" en el primordio muy joven (figuras 4, y 7). Pero cuando el primordio ha alcanzado una longitud de aproximadamente

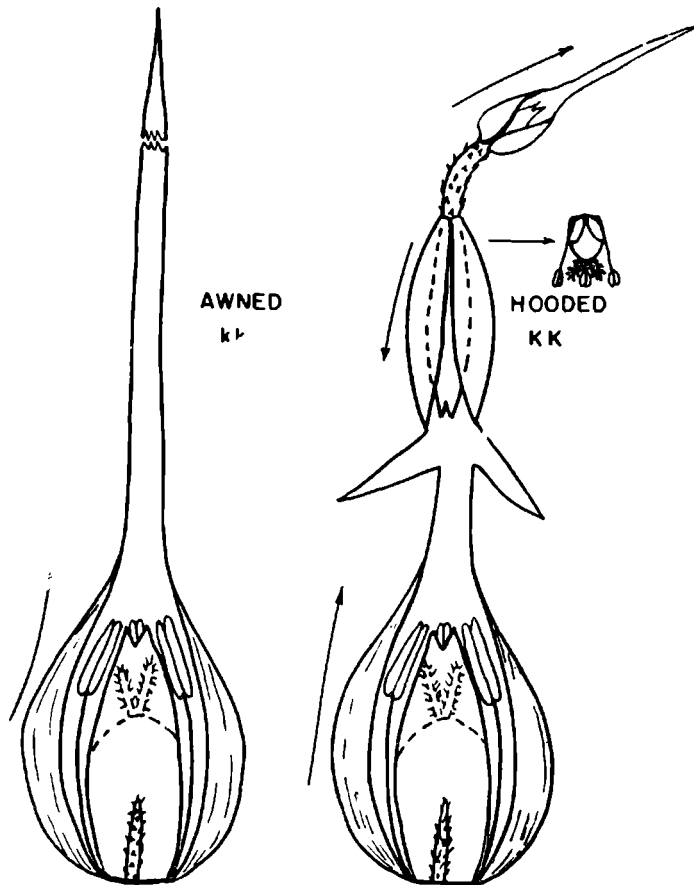


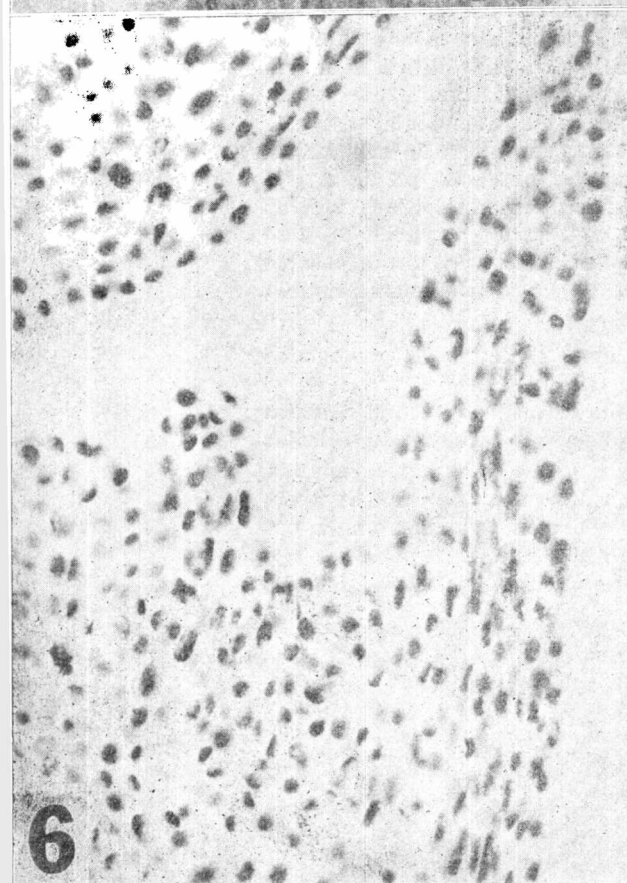
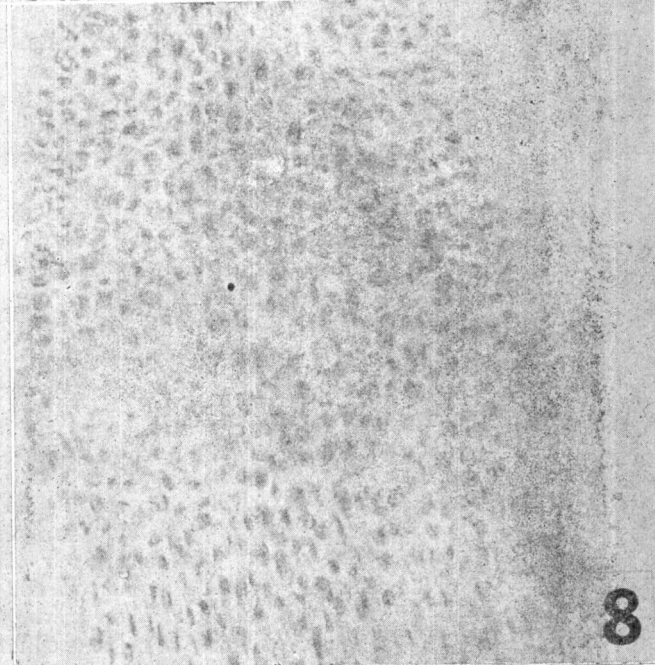
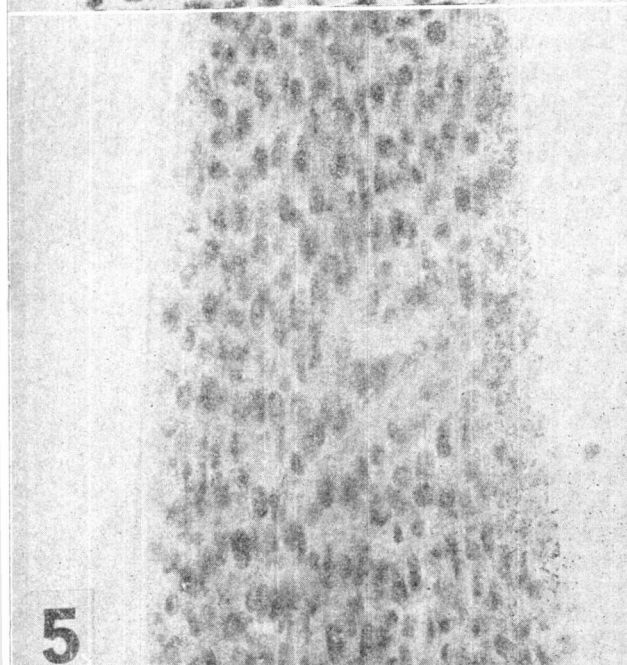
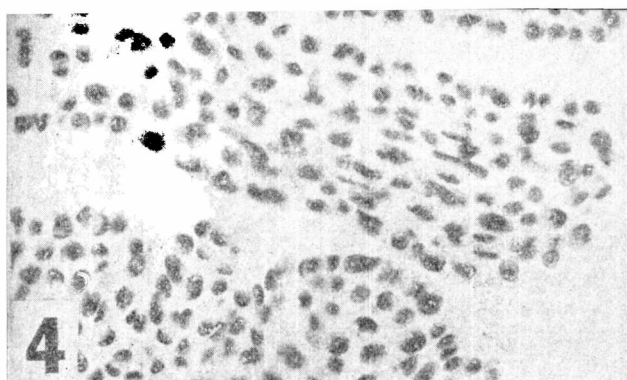
Fig. 3. -- Diagrama de la estructura de la capucha en la cebada encapuchada. Awned = aristada; hooded = encapuchada.

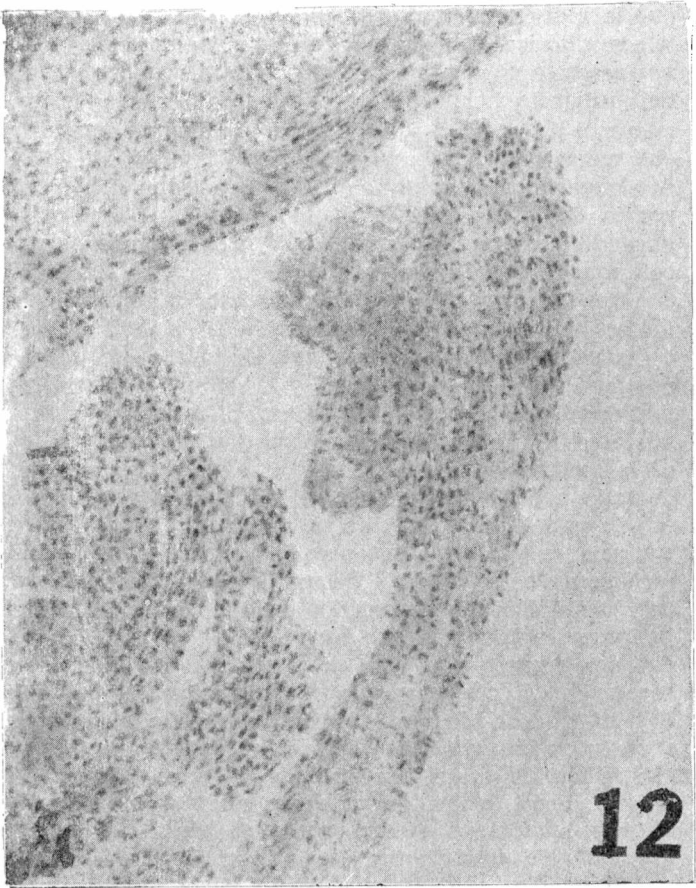
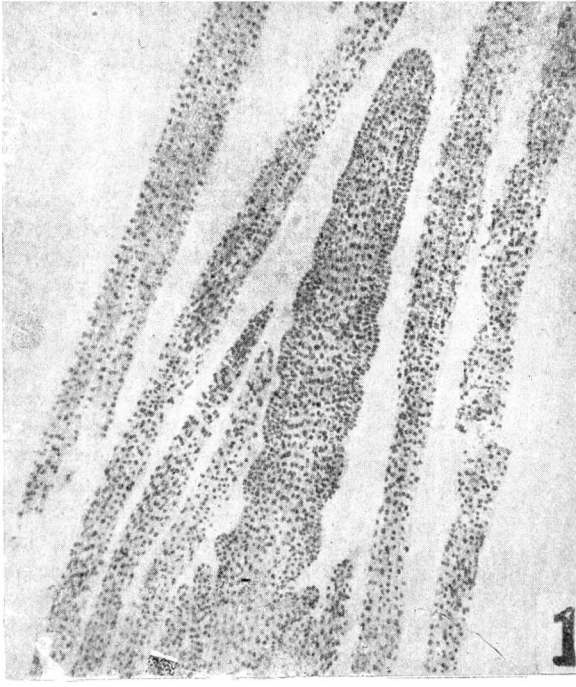
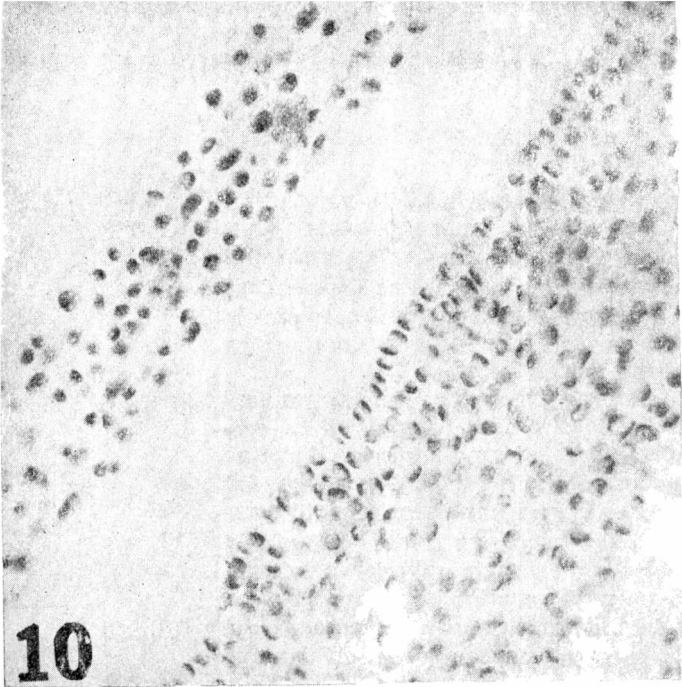
trescientos micrones, aparecen diferencias reconocibles en el comportamiento celular. En el genotipo "encapuchado", las células de la superficie superior (adaxial) de la mitad distal del primordio, se dividen más rápidamente y sufren menor elongación entre divisiones, de manera que resultan distintamente más pequeñas que las células correspondientes de "aristado" (figuras 5, 8). Además, en este estado de desarrollo, las células distales del primordio, en el genotipo "aristado", se dividen todas en dirección longitudinal, contribuyendo así a la longitud del primordio. Por otra parte, en la

variedad "encapuchada", las células epidérmicas se dividen tanto en dirección vertical como horizontal, de modo que el primordio crece muchos menos en longitud, pero resulta más ancho que el primordio correspondiente de la variedad "aristada". Las secciones longitudinales a través del primordio, en este estado, revelan el hecho de que las células inmediatamente debajo de la epidermis están dividiéndose en tres direcciones: longitudinalmente, horizontalmente y periclinalmente o perpendicularmente a la superficie de la lemma (figura 9). Estas divisiones convierten la superficie adaxial de la región distal del primordio de la lemma, en la variedad "encapuchada", en un cojín elevado y redondeado. La estructura histológica de este cojín es muy similar a la del primordio de la espiga de cualquier variedad de cebada en un estado mucho más temprano del desarrollo, cuando las espiguillas y órganos florales principales comienzan a diferenciarse (figuras 10 y 11; cf. también Bonnett, 1945). Luego que el cojín está bien desarrollado, los órganos florales y la raquilla se diferencian de él, esencialmente de la misma manera como lo hacen los órganos de las espiguillas normales en un estado más temprano del desarrollo (figura 12).

Estos hechos pueden relacionarse mejor con la acción génica suponiendo que las células del meristema apical y sus apéndices tienen en cualquier estado del desarrollo un *potencial de desarrollo* particular. Este puede definirse como el estado físico-químico de las células, que ha sido determinado por la interacción de los genes y el ambiente celular en estados previos del desarrollo. Ello determinará a su turno la secuencia de interacciones génico-ambientales que ocurrirán en estados más tardíos del desarrollo y producirán las estructuras del adulto. En un meristema apical normal de una gramínea tal como la cebada, sus células tienen primero el potencial de desarrollo para la formación de los primordios de las hojas basales o de la roseta, que llevan renuevos en sus axilas; luego el de formar primordios de las hojas de los culmos, las cuales difieren de las hojas basales en su estructura epidérmica y en la ausencia de renuevos axilares; y finalmente el de formar primordios de las espiguillas de la inflorescencia. Dentro de estos primordios de espiguillas, algunas células meristemáticas adquieren el potencial de desarrollo para glumas estériles, algunas para glumas o lemmas fértiles, y otras para los lodículos, estambres, ovario y raquilla. El potencial de desarrollo de las células de un tipo particular de primordio resulta normalmente restringido a la formación de los tejidos característicos de dicho primordio.

Sobre la base de este concepto, podemos decir que el gen *hooded* invierte la secuencia normal de potencialidades de desarrollo en el primordio de la lemma, de modo que las células en su mitad distal vuelven a la potencialidad de desarrollo que es característica de las células que pertenecen a los primordios jóvenes de las espiguillas. La estructura histológica del cojín, con sus capas de túnica y corpus características, es un signo visible de esta inversión en la potencialidad del desarrollo. Adoptando este concepto, podemos ver cómo una única acción génica primaria puede llevar al desarrollo





Figs. 4-9. — Fotomicrografías mostrando el desarrollo de la arista en una cebada aristada y de la capucha en una cebada encapuchada. 4, sección transversal del primordio de la arista, longitud de 150 micrones. 5, superficie adaxial de un primordio de la arista, longitud de 500 micrones. 6, sección longitudinal mediana del primordio, longitud de 400 micrones. 7-9, las mismas etapas en el desarrollo de la capucha. Todas las figuras magnificadas 500 x. Figs. 10 y 11. — Secciones transversales de la espiga primordial y de las hojas superiores, respectivamente. Ambas magnificadas 450 x. Fig. 12. Sección longitudinal de la cima del primordio de la capucha, en una etapa intermedia, mostrando los primordios de las partes de la flor abortiva 550 x.

de estructuras tan diversas como páleas, anteras, ovarios y raquillas, en posiciones donde no ocurren normalmente. En consecuencia, nuestra comprensión de la acción del gen *hooded* depende mayormente de saber lo máximo posible acerca de las diferencias bioquímicas e histológicas entre la región distal del primordio de la lemma de *hooded* y la región correspondiente del genotipo "aristado", en y antes del momento de la formación del cojín.

Las más obvias de estas diferencias son que las células primordiales en el tipo "aristado", están relativamente elongadas en este estado y se dividen casi completamente en una dirección longitudinal, mientras que las células correspondientes en "encapuchado" son mucho más pequeñas y se dividen en muchas direcciones. Si marcamos en una gráfica la longitud del primordio como abscisa y la longitud media de las células de la epidermis superior o adaxial como ordenada, encontramos que en el genotipo "aristado" la longitud de las células aumenta progresivamente con la longitud del primordio. Esto significa que la cantidad de elongación celular que ocurre durante un ciclo mitótico es, como un promedio, más grande que la reducción en tamaño causada por la división celular en telofase mitótica. Una gráfica similar para el genotipo "encapuchado" nos muestra que la longitud de las células aumenta con la longitud del primordio, hasta que los primordios tienen aproximadamente 300 micrones de longitud, y luego se reduce abruptamente. En este estado, que corresponde al comienzo de la formación del cojín, la cantidad de elongación celular ya no es igual a la reducción en tamaño causada por la división celular. Por eso, la primera acción visible del gen *hooded* es disminuir la rapidez de la elongación celular en relación con aquella de la división celular.

Una base química posible para este cambio es la siguiente: Un factor limitante de la división celular es la duplicación del ácido desoxirribonucleico, mientras que en una célula meristemática que no tiene vacuolas en aumento y posee una pared de gada, el factor limitante más probable de la elongación celular es la intensidad de la síntesis de la proteína citoplasmática. Otro posible factor limitante es la rapidez de incorporación de agua en el sistema coloidal; es decir la rapidez del cambio del citoplasma y del núcleo, desde un estado relativamente de gel a un estado de sol. Si la síntesis de proteína es limitante, entonces la reducción del tamaño celular en la lemma "encapuchada" debiera reflejarse en una razón reducida de "proteína/ácido desoxirribonucleico" en el tejido. Análisis preliminares indican que esto es así. Por otra parte, las comparaciones de peso húmedo con peso seco indican que las potencialidades de desarrollo del meristema de los primordios de la espiga y espiguillas, están asociadas con un contenido de agua más bajo que aquel encontrado en primordios de la hoja o de la lemma. En consecuencia, es posible que el comienzo de la formación del cojín en el primordio de la lemma de "encapuchada" esté asociado con una reducción simultánea en contenido de agua y síntesis de proteína, acompañada quizá por un aumento en la rapidez del ciclo mitótico.

Si nuestro análisis es correcto hasta aquí, entonces una comprensión final de la acción del gen *hooded* depende de la solución

de los problemas siguientes: Primero, ¿cuál es la diferencia primaria en acción bioquímica entre los a'elos "aristado" y "encapuchado" que pueda originar un cambio de la relación entre la síntesis de ácido desoxirribonucleico y aquella de las proteínas citoplasmáticas como un total o de alguna proteína crítica que sea limitante para el crecimiento citoplasmático? Segundo, ¿cómo puede esta reducción en elongación celular producir el cambio observado en la dirección de la división celular, desde un plano simple, longitudinal, como ocurre en "aristado", a tres planos de división como en el cojín del primordio de la lemma en el genotipo 'encapuchado'?

Con respecto a la diferencia bioquímica primaria, la única información adicional disponible actualmente es que el contenido de ciertos amino-ácidos libres en plántulas jóvenes, es diferente en los dos genotipos, y que estas diferencias aumentan cuando las plántulas se hacen crecer en una solución débil de cloranfenicol, substancia bien conocida como inhibidora de la síntesis de proteína (Sarkissian, Shah, and Stebbins, 1962). Los contenidos de alanina, ácido aminobutírico y ácido glutámico son significativamente más altos en plántulas de "encapuchado" que de "aristado", mientras que el de asparagina y glutamina es significativamente más bajo. La identificación de la simple reacción cambiada que altera el contenido de todos estos amino-ácidos, exigirá probablemente investigación bioquímica intensa por algún tiempo futuro, pero ya que todos ellos están conectados entre sí por trayectorias bioquímicas conocidas, es altamente probable la existencia de un solo cambio primario. La relación entre esta diferencia y la cantidad reducida de elongación celular en los primordios de la lemma de "encapuchado", puede resultar más clara cuando se haya analizado el contenido de amino-ácidos libres de tejidos en los estados críticos del desarrollo, así como de aquellos amino-ácidos que constituyen sus proteínas.

La relación entre elongación celular y dirección de la división celular, está siendo estudiada en una secuencia de desarrollo completamente diferente, aquella de los estomas de la hoja de las gramíneas. Sobre la epidermis de dichas hojas, como también de aquellas de todas las demás las demás monocotiledóneas con hojas lineares, las únicas divisiones mitóticas en que el huso está orientado en ángulo recto respecto del eje largo de la hoja, son aquellas que forman las células anexas y las células subsidiarias que se hallan al lado de ellas, cuando están presentes. Como se demostró en otro lugar (Stebbins and Shah, 1960), las divisiones de las células subsidiarias son inducidas por un estímulo que emana de la célula madre de las anexas y que probablemente controla la orientación del huso. En consecuencia, la división de la propia célula madre de la anexa es la que tiene mayor interés para nuestro problema. Nos preguntamos lo siguiente: ¿Por qué los husos de estas células en división se orientan en ángulo recto con respecto a aquellos de todas las demás divisiones mitóticas autónomas de las células epidérmicas?

Una respuesta parcial a esta pregunta se obtuvo de experimentos que actualmente se están conduciendo en nuestro laboratorio (Shah, 1962) en las cuales el huso de una cierta proporción de las divisiones de la célula madre de la anexa, ha sido reorientado de una

manera repetible y pronosticable de modo que yace en dirección longitudinal, y produce células anexas proximales y distales entre sí, más bien colaterales. Este resultado se ha obtenido por inmersión de plántulas jóvenes durante una hora en soluciones débiles (0,075-0,2 molar) de 2-mercaptoetanol. Como lo descubrió mi colega el doctor Daniel Mazia (Mazia, 1958), esta sustancia no tiene efecto sobre la duplicación del ácido desoxirribonucleico, pero interfiere con el ciclo mitótico evitando o retardando la formación del huso. Tiene poco o ningún efecto sobre la elongación celular, y en las concentraciones usadas no es en absoluto tóxico. En consecuencia, el efecto del tratamiento de mercaptoetanol es retardar la iniciación de las mitosis a la vez que permitir que la elongación lineal de las células epidérmicas prosiga normalmente. Como resultado, las células madres de las anexas son más largas en relación a su ancho, en el momento en que se dividen. Un número de hechos me han llevado hacia la hipótesis de que este cambio en la forma de la célula es indirectamente responsable del cambio de orientación del huso mitótico. Si esto es correcto, otras sustancias químicas que promueven la elongación celular debieron entonces actuar sinérgicamente con el mercaptoetanol para aumentar la frecuencia de las divisiones proximales-distales reorientadas de las células madres de las anexas. El Dr. Shah ha sido capaz de producir este efecto combinando concentraciones débiles de mercaptoetanol con distintas concentraciones de giberelina. Recíprocamente, cualquier agente que retardara la elongación celular después del tratamiento con mercaptoetanol debiera contrarrestar su efecto productor de orientaciones proximales-distales.

Los experimentos recién mencionados parecen establecer una relación, en ciertos tejidos vegetales, entre la rapidez del ciclo mitótico, la intensidad de la síntesis de ácido desoxirribonucleico, la forma celular, y la orientación de la división celular. Si se encuentra que está difundida la relación que existe aparentemente en el desarrollo de los estomas, su significación para la morfogénesis será muy grande. Su aplicación a la acción del gen *hooded* es la siguiente: De acuerdo con la hipótesis presente, *hooded* altera la velocidad de alguna reacción relacionada con la síntesis de proteína. En la mayoría de los tejidos esta relación alterada no tiene efectos finales visibles. Esto es debido probablemente a que la intensidad de la elongación celular, aunque retardada, nunca alcanza el punto crítico, con relación a la intensidad del ciclo mitótico, que determina una reorientación del huso. Pero en el primordio de la lemma, el estado del desarrollo de trescientos a quinientos micrones es uno en el cual la intensidad en el ciclo mitótico aumenta, tanto en el genotipo "aristado" como en el "encapuchado" y en *kk* ("aristado") está asociado con la iniciación del crecimiento rápido de la arista larga. En el genotipo "aristado" la síntesis de proteína y la elongación celular normales siguen el ritmo de esta intensidad de mitosis aumentada, pero la síntesis de proteína relativamente ineficiente de "encapuchado", hace esto imposible. En consecuencia las células se alargan menos rápidamente en la profase mitótica en "encapuchado" que en "aristado", y este cambio de forma y rapidez de elongación produce su tendencia de dividirse en tres planos en lugar

de uno. La masa sólida de pequeñas células así construida, adquiere luego las características físico-químicas y el potencial de desarrollo del primordio de la espiguilla, de manera que el curso normal del desarrollo es desviado hacia la diferenciación extra de los órganos reproductivos característicos de la "capucha".

La significación de una relación general entre elongación celular y orientación de la división celular puede verse en el diagrama que mostramos en la figura 13. Si suponemos que la elongación celular es mayormente unidireccional, como lo es en los filamentos, hojas lineares, las capas de la túnica del meristema, y en el desarrollo temprano de los primordios de los apéndices en emergencia, la forma de una célula en profase mitótica dependerá entonces de la cantidad de elongación que haya ocurrido desde la profase previa. Si la longitud celular se duplica durante este período, cada célula en profase tendrá aproximadamente la misma forma (figura 13: 1A-1C), mientras que si no ocurre elongación durante un ciclo mitótico, la relación "longitud/anchura" será en profase la mitad de la que fue en la profase precedente (figura 13: 2A-2C). Suponiendo que en estas células meristemáticas evacuoladas el huso está generalmente orientado paralelamente al eje largo de la célula o al eje que se está alargando más rápidamente, las divisiones celulares sucesivas, acompañadas por una gran cantidad de elongación, celular, producirán un filamento o una estructura lineal (figura 13: 1D), habiéndose dividido todas las células en la misma dirección; mientras que la división celular no acompañada por elongación hará que la forma celular sea diferente después de cada división mitótica, y producirá por eso una estructura ancha y chata, o sólida, debido a la orientación de husos sucesivos en dos o tres planos (figura 13: 2D).

Sobre la base de esta hipótesis, yo pronosticaría que en las estructuras filamentosas o alargadas, como el joven gametofito de un musgo o un helecho, o la raicilla en crecimiento de cualquier planta vascular, la intensidad de la síntesis de elementos citoplasmáticos en relación con la síntesis de ácido nucleico, sería relativamente alta, mientras que en estructuras sólidas como el embrión joven de un musgo o el esporofito de un helecho, o el primordio de una inflorescencia sólida como el capítulo de un miembro de las compuestas, se encontraría que la intensidad de la síntesis citoplasmática sería más baja relativamente a aquella de la síntesis de ácido nucleico.

Los dibujos en la mitad derecha de la figura 13, ilustran otra situación que no es rara en las plantas superiores. Si ocurre una división asimétrica en un tejido meristemático, ambas células hijas pueden ser capaces de dividirse nuevamente, pero una de ellas puede recibir elementos citoplasmáticos que estimulan un aumento en la intensidad del ciclo mitótico, mientras que la otra célula hija recibirá menos de estos elementos. En este caso, el desarrollo subsiguiente será como en las figuras 13: 3C-3D. Es evidente la semejanza de estas figuras con el desarrollo temprano del embrión y suspensor de una angiosperma. Las observaciones de Reuter (1953) sobre la transición desde la forma filamentosa a la chata de un joven protalo de helecho, indican que este cambio en la forma está acompañado por una reducción en la razón "longitud/ancho" de las

células. En los primordios de las espiguillas de cebada he observado numerosas divisiones asimétricas en la región desde la cual emergen los primordios de la lemma, justamente antes de la aparición de las primeras divisiones periclinales que dan origen a estos primordios. Es por eso posible que las divisiones periclinales que inician la emergencia de los primordios de los apéndices, a partir del meristema apical, resulten de divisiones asimétricas en el ciclo mitótico previo, las cuales proveen a ciertas células de elementos inductores de mitosis, en mayor cantidad que a las células vecinas. Tales células sufrirían una menor elongación periclinal (paralela a la superficie del meristema) antes de entrar en la próxima división mitótica, y así

INTERACCIÓN ENTRE ELONGACIÓN CELULAR Y DIVISIÓN CELULAR EN LA DETERMINACIÓN DE LA FORMA

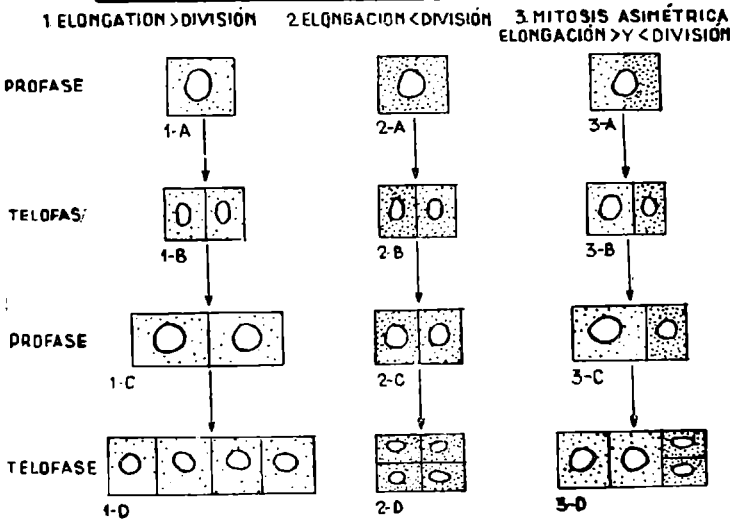


Fig. 13. — Diagrama que muestra la acción recíproca entre elongación celular y división celular, que determina la forma de un órgano vegetal. Explicación en el texto

tendrían a menudo su dimensión más larga anticlinalmente, o en ángulos rectos a la superficie del meristema. Un estudio cuidadoso de los meristemas apicales, teniendo esta hipótesis presente, puede arrojar alguna luz sobre el problema del origen de los primordios de los apéndices, que hoy es pobremente comprendido.

Debe recalarse el hecho de que la correlación entre forma celular y orientación del huso mitótico no es de ninguna manera universal, y que no puede aplicarse a células con vacuolas grandes. Sin embargo, en tales células puede haber una tendencia del huso a orientarse en la dirección del eje más largo del citoplasma disponible. Las divisiones de las microsporas de *Tradescantia*, según fueron estudiadas por Sax y Edmonds (1933, Sax 1935) constituyen un ejemplo. En el momento de la división que forma los núcleos genera-

tivo y vegetativo, la microspora posee dos grandes vacuolas, de modo que el eje más largo del citoplasma disponible está en ángulo recto con el eje largo de la microspora. Por eso, el huso se orienta en esta posición. Pero si las plantas se crían a temperaturas muy altas o muy bajas, hay ausencia de vacuolas en muchas microsporas en este estado, y en estas células el huso mitótico se orienta paralelamente al eje largo de la célula. El hecho de que el huso de las células cambiales en división esté orientado diagonalmente o en ángulos rectos con respecto a su eje largo, se relaciona probablemente con la presencia de grandes vacuolas en estas células (Bailey, 1930).

LOS PROBLEMAS PRINCIPALES QUE REQUIEREN SOLUCION

Esta discusión de la relación entre acción génica y forma, puede resumirse formulando preguntas específicas que, en mi opinión, deben responderse para que nos den una comprensión real de la trayectoria desde el gen hasta el carácter. Ellas son las siguientes: *Primero*: ¿poseen los organismos superiores cualesquiera mecanismos de regulación de la acción génica, que no existan en bacterias y virus? En particular, ¿juega el nucléolo un rol en tal regulación? *Segundo*: ¿en qué grado el control génico del metabolismo celular es alcanzado indirectamente, por el control de la intensidad a la cual las substancias reguladoras del crecimiento, tales como auxina y giberellina, son sintetizadas y acumuladas en las células, y en qué grado las relaciones de síntesis nucleares y citoplasmáticas son determinadas directamente por reacciones enzimáticas controladas génicamente? *Tercero*: ¿cuán difundida está la correlación entre forma celular y orientación de la división celular, y en qué grado depende esto de la relación entre la intensidad de la síntesis de proteínas citoplasmáticas y de ácido nucleicos? *Cuarto*: ¿qué fuerzas gobiernan la distribución polarizada desigual, de elementos citoplasmáticos dentro de la célula, que es responsable de las mitosis asimétricas y del subsiguiente comportamiento diferencial de las células hijas provenientes de tales mitosis? ¿Cuáles son los elementos citoplasmáticos significativos que son distribuidos desigualmente? *Quinto*: ¿en qué grado las mitosis asimétrica inician la diferenciación celular? En particular, ¿son tales mitosis responsables de la iniciación de las divisiones periclinales que dan origen eventualmente a los primordios de los apéndices? Si no es así, ¿cuáles son las condiciones celulares que producen estas divisiones, así como los demás tipos de diferenciación celular no asociados con mitosis asimétricas? *Sexto*: ¿cuán difundido está el fenómeno de la inducción mitótica que es responsable de la formación de las células subsidiarias en el complejo estomático de las monocotiledóneas? ¿Cuál es el estímulo inductor? *Séptimo*: ¿qué factores gobiernan la dirección en que las células se alargan a medida que maduran? *Octavo*: ¿En qué grado está controlada la forma de los órganos en las plantas superiores, por la intensidad y posición a las cuales resultan diferenciados los

haces vasculares, controlando por eso el transporte de nutrientes y substancias de crecimiento a través de los primordios?

Aunque podrían formularse muchas otras preguntas sobre la acción de los genes en el desarrollo de las plantas superiores, me parece que estas son las más significativas. Ellas son definidas y de alcance relativamente limitado. Pueden planearse experimentos para responderlas, usando varias de las técnicas más recientes ahora disponibles, que serán enumerados en la sección final de esta disertación.

TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACCION GENICA EN LA MORFOGENESIS

Me gustaria finalizar mi disertación enumerando las distintas técnicas que están ahora a nuestra disposición para explorar la trayectoria desde el gen hasta el carácter. Aunque todas estas han sido aplicadas exitosamente a las plantas superiores, ninguna planta individual ha sido estudiada mediante todas ellas, y muy pocas se han aplicado al análisis de diferencias genéticas conocidas. Comenzando con las que están más en el nivel descriptivo, y terminando con aquellas que exigen los experimentos más elaboradamente planeados, ellas son las siguientes:

La ultraestructura de diversas células puede explorarse por el uso del microscopio electrónico. Las fotografías así obtenidas nos dan información sobre orgánulos tales como los mitocondrios, retículo endoplasmático, y los ribosomas, que son asiento de los procesos químicos más importantes del metabolismo celular. Los métodos histoquímicos, tales como el método del "verde de metilo - pironina" para ácidos nucleicos (Lance, 1957) y las distintas técnicas para aislar y demostrar por tinción diferencial la actividad de las enzimas respiratorias, y de otras enzimas (Avers, 1958; Avers and Grimm, 1959), nos están capacitando para establecer las conexiones entre estructura de tejidos y actividad química, por modificación de los métodos convencionales. La técnica del cultivo de órganos, tejidos (Wetmore, 1954) y células o grupos de células aislados (Steward, 1958) está actualmente lo suficientemente bien estandarizada para que puedan estudiarse, bajo condiciones controladas, las reacciones de estas partes aisladas, tanto con respecto a su medio interno como entre sí. Entre los tipos más importantes de hechos que nos han dado estas técnicas, están los que se relacionan con la cantidad de interdependencia que existe entre las células de las partes en desarrollo de las plantas. Organos completos, tales como raíces, hojas, ápices de los renuevos, y ovarios, pueden desarrollar en forma perfectamente normal cuando se separan del resto de la planta y se les da una nutrición apropiada (Wetmore, 1954; Steeves and Sussex, 1957). Por otra parte, células aisladas de plantas superiores son incapaces de diferenciarse en cualesquiera de los medios que hasta ahora se les han suministrado, aunque cuando se forman grupos relativamente grandes de células asociadas irregularmente, las células interiores de estos grupos pueden comenzar a diferenciarse (Steward,

1958). Estos experimentos nos dicen que las interacciones celulares más importantes en el desarrollo y la diferenciación son probablemente aquellas entre células y tejidos adyacentes del mismo órgano. Se han realizado estudios directos de tales interacciones por medio de operaciones quirúrgicas en los ápices en crecimiento (Snow and Snow, 1952; Wardlaw, 1950; Ball, 1952 a, b, 1956; Loiseau, 1959). Estos experimentos nos han demostrado claramente que la disposición de las hojas sobre un tallo está determinada por factores inherentes del ápice del renuevo real en que aquellas están produciéndose, y que las interacciones celulares entre los primordios más jóvenes y el meristema apical no diferenciado son de las más importantes en la determinación de esta disposición. Sin embargo, aun no es clara la naturaleza de estas interacciones.

El rol de las auxinas en la determinación de patrones de crecimiento ha sido reconocido de larga data. En años recientes el reconocimiento de las cinetinas, giberelinas y otras sustancias reguladoras del crecimiento, ha alterado considerablemente nuestra comprensión de su rol en el desarrollo (Lockhart, 1961; Kefford and Goldacre, 1961). Por otra parte, el conocimiento de la actividad química de estas sustancias en el metabolismo celular, ha probado ser particularmente difícil de obtener. En consecuencia, la relación entre la acción génica y la actividad de las sustancias reguladoras del crecimiento, es aun casi completamente desconocida.

Los análisis químicos de partes de las plantas están revelando diferencias significativas entre partes de la misma planta, así como entre partes correspondientes de genotipos diferentes. Los análisis más importantes son aquellos que revelan el contenido y las proporciones de los amino-ácidos libres, el contenido y la naturaleza de las proteínas, y particularmente el de los ácidos nucleicos, incluyendo tanto desoxirribonucleico como ribonucleico. Las técnicas bioquímicas modernas están mejorando rápidamente tanto la rapidez como la seguridad con que puede realizarse tales análisis.

Quizá las técnicas químicas más útiles para estudios de desarrollo son aquellos que se han ideado recientemente para estudiar síntesis químicas en células y tejidos. El uso de los análogos químicos de las purinas, pirimidinas y amino-ácidos, para bloquear síntesis químicas específicas, está ejemplificado por los experimentos de Heslop-Harrison, mencionados antes. El uso de la autorradiografía para analizar trayectorias químicas específicas y localizar la posición en los tejidos de síntesis particulares, posee posibilidades aun mayores para ensanchar nuestro conocimiento del desarrollo. Sin embargo es una técnica de lo más exigente, y es probable que sea lento el progreso en su aplicación a problemas de desarrollo.

Finalmente, el valor de todas estas técnicas para explorar la trayectoria desde el gen hasta el carácter está aumentando considerablemente por el desarrollo de técnicas crecientemente precisas de control experimental. La reacción del genotipo frente a su ambiente externo está siendo reducida al mínimo y cuidadosamente regulada por el uso de cámaras de control del crecimiento o fitotrones, en

los cuales los últimos adelantos de la ingeniería moderna han sido puestos al servicio del botánico. Se ha logrado el control del genotipo para estudios individuales de desarrollo por el uso de líneas puras genéticamente uniformes en el caso de las plantas anuales, y de divisiones clonales en las perennes. Por otra parte, el rol de los genes en el desarrollo no podrá ser comprendido hasta que la mayoría o todas estas técnicas hayan sido aplicadas a plantas que difieren en uno o dos factores mendelianos conocidos y aislados. Tal material genéticamente controlado ha sido escasamente usado en absoluto para estudios de morfogénesis; su uso es esencial para estudios de la acción génica en la morfogénesis y lo será quizá desde el mayor paso simple hacia adelante en el aumento de nuestro conocimiento de esta materia.

A partir de la información que he revisado, creo que ustedes pueden ver cuan grande, complejo y multilateral es el problema total de la acción génica en las plantas superiores. Por otra parte, algunos elementos del mismo están haciéndose rápidamente mejor comprendidos y el surgido de nuevas técnicas por las cuales puede ser estudiado es de lo más imponente. En consecuencia hay aquí un campo en que las investigaciones coordinadas y multilaterales por medio de los métodos conocidos, probablemente rindan una rica cosecha de progreso científico en los próximos años.

LITERATURA CITADA

- AVERS, C. J., 1958. Histochemical localisation of enzyme activity in the root epidermis of *Phleum pratense*. Amer. Jour. Bot. 45: 609 - 613.
- AVERS, C. J., and R. B. Grimm, 1959. Comparative enzyme differentiation in grass roots. Acid phosphatase. Amer. Jour. Bot. 46: 190 - 193.
- BAILEY, I. W., 1930. The cambium and its derivative tissues. V. A reconnaissance of the vacuole in living cells. Zeitschr. Zellf. Mikr. Anat. 10: 651 - 682.
- BONNETT, O. T., 1945. The development of the barley spike. Jour. Agr. Res. 51: 451 - 457.
- BRACHET, J., 1960. The Biochemistry of Development. 320 pp. Pergamon Press, London and New York.
- CLAUSEN, J. AND W. M. HIESEY, 1958. Experimental studies on the nature of species IV. Genetic structure of ecological races. Carnegie Inst. Wash. Publ. Nº 615: 312 pp.
- HESLOP-HARRISON, J., 1960. Suppressive effects of 2-thiouracil on differentiation and flowering in *Cannabis sativa*. Science 132: 1943 - 1944.
- JACOB, F. AND J. MONOD, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. Jour. Molecular Biol. 3: 318 - 356.

- LANCE, A., 1957. Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques meristemes apicaux et sur les variations provoquées par des traitements photopériodiques. *Ann. Sci. Nat. ot. sér.* 11, 18: 91 - 422.
- MAZIA, DANIEL, 1958. SH compounds in mitosis. I. The action of mercaptoethanol, on the eggs of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Experimental Cell Res.* 14: 486 - 494.
- MCCCLINTOCK, B., 1961. Some parallels between gene control systems in maize and in bacteria. *Amer. Nat.* 95: 265 - 277.
- REUTER, L., 1953. A contribution to the cell - physiologic analysis of growth and morphogenesis in fern prothallia. *Protoplasma.* 42: 1 - 29.
- SARKISSIAN, I., S. S. Shah, AND G. L. STEBBINS, 1962. Differences in amino acid content of seedlings of awned and hooded barley, and their alteration by chloramphenicol treatment. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48: (in press).
- SAX, K., 1935. The effect of temperature on nuclear differentiation in microspore development. *Jour. Arnold Arboretum* 16: 301 - 310.
- SAX, K. AND K. W. EDMONDS, 1933. Development of the male gametophyte in *Tradescantia*. *Bot. Gaz.* 95: 156-163.
- SHAH, S. S. AND G. L. Stebbins, 1962. Change in direction of cell division in stomatal initials of *Hordeum vulgare* induced by 2-mercaptoethanol (abstract). *Amer. Jour. Bot.* 49: 657.
- STEBBINS, G. L. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press 643 pp.
- STEBBINS, G. LEDYARD, 1959. The role of hybridization in evolution. *Proc. Amer. Phil. Soc.* 103: (2): 231 - 251.
- STEBBINS, G. L. AND S. S. SHAH, 1960. Stomatal development in the leaf epidermis of certain grasses. *Developmental Biol.* 2: 477-500.
- WERZ, G., 1961. Zur frage der herkunft und verteilung cytoplasmatischer ribonucleinsäure und ihrer beziehungen zu "morphogenetischen substanzen" bei *Acetabularia mediterranea*. *Zeitschr. Naturfors.* 16 (2): 126 - 129.
- WOODS, P. S., 1959. RNA in nuclear - cytoplasmic interaction. *Brookhaven Symp. Biol.* 12: 153-171.