



1
24
Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

"Estudio ultraestructural comparativo del núcleo celular interfásico
de *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C. H. Ramos
(Triuridales: Lacandoniaceae) y *Triuris alata* Brade
(Triuridales: Triuridaceae)"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
Lourdes Teresa Agredano Moreno



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	7
1. La selva lacandona	7
2. <i>Lacandonia schismatica</i> E. Martínez & C.H. Ramos	9
2.1 Distribución geográfica, hábitat y ecología ...	9
2.2 Morfología	11
2.3 Ubicación taxonómica	14
2.4 Grupos afines	14
3. <i>Triuris alata</i> Brade	15
3.1 Distribución geográfica, hábitat y ecología ...	15
3.2 Morfología	16
3.3 Ubicación taxonómica	20
3.4 Grupos afines	20
4. Núcleo celular interfásico vegetal	23
III. Objetivos	35
IV. Metodología	36
V. Resultados	42
VI. Discusión	66
VII. Conclusiones	69
VIII. Referencias	70

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la ultraestructura del núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae), planta cuyo rasgo morfológico más característico es la inversión de los verticilos sexuales, y se comparó con el de la especie afín *Triuris alata* (Triuridaceae), ambas del orden Triuridales. Se aplicaron la técnica convencional para microscopía electrónica (acetato de uranilo-citrato de plomo) y la tinción preferencial para ribonucleoproteínas descrita por Bernhard (1969).

Se procesaron botones florales en diferentes etapas de desarrollo. Se utilizaron dos fijadores: glutaraldehído 2.5% en buffer de fosfatos 0.2M a pH 7.2 y glutaraldehído 2%/Paraformaldehído 4% en el mismo buffer. En algunos casos se llevo a cabo una postfijación con tetraóxido de osmio. Los fragmentos de botones se deshidrataron, se incluyeron en una resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60°C. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de grosor y se analizaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80 kv.

Los resultados obtenidos indican que los núcleos de *L. schismatica* y *T. alata* son muy semejantes en su organización ultraestructural general al de otras monocotiledóneas pero difieren por presentar: 1) estructuras anulares con un componente central probablemente de naturaleza ribonucleoproteica, 2) estructuras tipo complejo sinaptonémico en células somáticas del tegumento de *L. schismatica* y en células somáticas del tegumento y del receptáculo de *T. alata* y 3) abundantes gránulos EDTA positivos en los espacios inter y pericromatiniano con un tamaño intermedio al de los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos descritos hasta el momento para animales y plantas.

I. Introducción

Las angiospermas son un grupo de plantas muy diverso que ocupa una amplia gama de hábitats. Presentan los siguientes caracteres distintivos: vasos en el xilema, elementos cribosos y células acompañantes en el floema, un saco embrionario de ocho núcleos (un huevo, dos sinérgidas, tres antípodas y dos polares), doble fecundación y carpelos cerrados. Existen numerosas excepciones a estas características. Son importantes para la continuidad de la existencia humana y han sido objeto de investigaciones intensivas y extensivas. A pesar del interés que se tiene en ellas, nuestro conocimiento es todavía muy pequeño si lo comparamos con nuestra ignorancia (Scagel, 1987). Se han propuesto un sinnúmero de teorías acerca del origen y subsecuente evolución de las angiospermas, pero ninguna ha sido aceptada universalmente.

Desde tiempos muy primitivos, los seres humanos han intentado clasificar a las angiospermas por las diferencias que se observan en ellas. Las clasificaciones elaboradas han variado según el nivel de conocimiento de las plantas, lo cual es consecuencia de la tecnología científica disponible, y los objetivos generales que influyen en el proceso de la clasificación. Las culturas anteriores al uso de la escritura clasificaban a las plantas de acuerdo con su utilidad, ya fueran

comestibles, venenosas o medicinales. Conforme se ampliaron los propósitos de la clasificación, los criterios también han cambiado. En la actualidad, los especialistas en taxonomía procuran tomar en cuenta tantos caracteres como sea posible cuando elaboran las clasificaciones.

Las primeras clasificaciones fueron naturales, propuestas por Bauhin, John Ray, Michel Adanson, De Jussieu, Bentham y Hooker, y De Candolle entre otros. Posteriormente surgieron las clasificaciones artificiales propuestas por De Tournefort y Linneo. Algunos de los grupos reconocidos en las artificiales son naturales y válidos hasta nuestros días. En la actualidad las plantas se agrupan de acuerdo con sus relaciones naturales y filogenéticas (Jones, 1988).

Se ha prestado mucha atención a los intentos por comprender las relaciones entre los órdenes y familias de las angiospermas. Varios investigadores han propuesto una serie de tendencias evolutivas interrelacionadas, y con base en esto han construido esquemas que sugieren determinadas relaciones entre los taxa principales de las angiospermas. Para apoyar estos esquemas, los taxónomos han incorporado datos bioquímicos, citoquímicos y genéticos, siendo una herramienta importante la aplicación de la microscopía electrónica.

Jiménez-García, et al. (1989), estudiaron las variaciones

evolutivas de la ultraestructura nuclear de organismos representativos de los reinos Animalia, Plantae, Fungi y Protoctista, utilizando técnicas preferenciales para ribonucleoproteínas (RNP) y cromatina. Encontraron una extraordinaria similitud en los rasgos morfológicos generales de las partículas ribonucleoproteicas y el arreglo de la cromatina en Animalia, Plantae y Fungi e importantes variaciones de estos rasgos en Protoctista. Sus observaciones sugieren que los mayores cambios evolutivos en la estructura nuclear anteceden a la adquisición de plástidos por los ancestros de las plantas verdes y que una vez evolucionado, el patrón estructural nuclear se ha conservado en plantas y animales (Jiménez-García et al., 1989). El trabajo anterior muestra que el estudio citoquímico ultraestructural del núcleo, es una herramienta útil que contribuye a la definición de grandes grupos de organismos.

La estructura de la flor ha sido básica para todos los sistemas de clasificación que intentan reflejar la filogenia. Actualmente se reconoce gran diversidad de tipos florales los cuales presentan un patrón estructural básico común, es decir, la posición relativa de los verticilos sexuales con respecto a un eje central es invariablemente la misma (De Candolle, 1813; Takhtajan, 1969; Hutchinson, 1959; Cronquist, 1981). Sin embargo, recientemente se encontró en la selva lacandona, Chiapas, un tipo floral nuevo para la ciencia, el cual rompe con el patrón hasta ahora conocido para las angiospermas. Dicho tipo floral

posee la característica (nunca antes conocida para las angiospermas), de tener el gineceo externo y el androceo interno lo que lo constituyó en una familia, género y especie nuevos para la ciencia. Dicha familia recibe el nombre de Lacandoniaceae y comprende un solo género y especie: *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C. H. Ramos. A pesar de la importancia evolutiva de ésta especie su existencia se ve seriamente amenazada ya que se pretende crear potreros en el área que actualmente ocupa.

El hallazgo de *L. schismatica* por Martínez y Ramos en 1989 ha desencadenado una serie de estudios sobre su anatomía reproductiva (Márquez-Guzmán et al, 1989), sobre su número cromosómico (Davidse & Martínez, 1990), y entre los estudios que actualmente se realizan están los de cultivo de tejidos y del núcleo celular interfásico.

No se había tenido la oportunidad de estudiar las modificaciones del núcleo celular interfásico como consecuencia de un evidente proceso macroevolutivo. Esta oportunidad la da el hallazgo de *L. schismatica* que posiblemente se originó por macroevolución. Este proceso (Grant, 1985), puede ocurrir en poblaciones pequeñas, restringidas a áreas con condiciones ambientales estables como es el caso de *L. schismatica*. Además, esta especie posee la característica de tener la posición invertida de los verticilos sexuales.

El presente trabajo es un estudio comparativo del núcleo celular interfásico de *L. schismatica* y *T. alata* que pretende aportar elementos para el conocimiento de las relaciones filogenéticas de las especies antes mencionadas, mediante la investigación de su ultraestructura. Este trabajo forma parte del proyecto "¿Qué alteraciones del núcleo ha producido la discontinuidad macroevolutiva que generó a *L. schismatica*?", a cargo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., que pretende, mediante el estudio del arreglo de la cromatina y de los rasgos de las partículas ribonucleoproteicas, aportar información que ayude a ubicar filogenéticamente la familia Lacandoniaceae; conocer el significado de las variaciones encontradas en el núcleo celular interfásico de la especie, si las hay, con respecto a otras angiospermas; plantear hipótesis sobre el significado de la inversión en el orden de los verticilos sexuales y por último, tratar de entender las implicaciones que esta planta tiene en los mecanismos de la evolución en angiospermas.

II. Antecedentes

1. La selva lacandona

Las selvas húmedas constituyen el ecosistema más complejo y diverso que existe en la tierra, pero a la vez uno de los más frágiles y difíciles de recuperar (Gómez-Pompa et al., 1972).

Esta formación vegetal tiene su máximo desarrollo en los cinturones que rodean al Ecuador y casi en ningún caso se extiende más allá de los trópicos. Es precisamente en esta faja intertropical donde se presentan a lo largo del año condiciones de elevada temperatura y humedad, las cuales permiten su existencia (Meave, 1990).

América es el continente que cuenta con la zona más vasta e inexplorada del mundo cubierta por selva húmeda. Esta se extiende en las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas. Ocupa porciones importantes de Venezuela, Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y las tres Guayanas (Ayenuz, 1981).

La selva colombiana se prolonga de manera más o menos continua hacia el norte, introduciéndose por la costa atlántica de Centroamérica hasta entrar en México, en donde alcanza su límite boreal.

Las selvas húmedas de México no se han estudiado con la misma intensidad en las distintas regiones del país. La zona lacandona ha sido pobremente estudiada en comparación con otras zonas tropicales en el sureste mexicano, no sólo desde el punto de vista ecológico sino también en el aspecto florístico (Meave, 1990). Este mismo autor, llevó a cabo uno de los estudios más recientes e importantes para el área, realizando un análisis detallado sobre la estructura de la vegetación que crece en los alrededores de la zona arqueológica de Bonampak, el cual fué acompañado de una lista florística.

En la actualidad se lleva a cabo el proyecto Flora Mesoamericana (Instituto de Biología, UNAM), en el cual se dieron a conocer por primera vez *L. schismatica* y *T. alata*, objetos de estudio en el presente trabajo (Martínez & Ramos, 1989).

La vegetación que cubre la zona lacandona se conoce en México como selva alta perennifolia según la clasificación de Miranda y Hernández X. (1963), o bosque tropical perennifolio, nombre que se utiliza con un criterio más amplio (Rzedowski, 1978), pero actualmente se sabe que es un mosaico de vegetación muy complejo (García, 1989; E. Martínez, com. pers.).

Desde el punto de vista fitogeográfico, la zona lacandona se encuentra en la provincia florística de Yucatán y las serranías transístimas de Rzedowski (1978). Este último autor considera

que la vegetación de la zona lacandona está afectada por las modificaciones que ocurrieron hace siglos, durante el desarrollo de la cultura maya. Sin embargo, estudios recientes (Meave, 1990) consideran que la porción de la selva que fué ocupada y alterada por los mayas, tuvo tiempo suficiente para recuperar los rasgos estructurales más generales de una selva intacta y que por lo tanto, parece que los signos de perturbación más evidentes se pueden relacionar con la historia reciente.

2. *Lacandonia schismatica* E. Martínez y C.H. Ramos

2.1 Distribución geográfica, hábitat y ecología

Sólo se ha encontrado en la localidad tipo, en selva alta subperennifolia inundable de *Calophyllum brasiliense* Camb, con *Terminalia amazonia* (J.F.Gmel) Exell y *Cryosophila argentea* Bartlett. Vive sobre substratos de materia orgánica muy húmedos, pero no inundados, en lugares muy sombreados con poca oscilación de temperatura. La localidad tipo (Fig.1) se sitúa en el borde de la zona núcleo de la Reserva Integral de la Biosfera Montes Azules en el municipio Ocosingo, Crucero Corozal, 170 km al SE de Palenque, camino a Boca Lacatum, sobre la carretera fronteriza del sur, Chiapas, México (Martínez & Ramos, 1989).

L. schismatica forma parte del sotobosque de la selva, florece

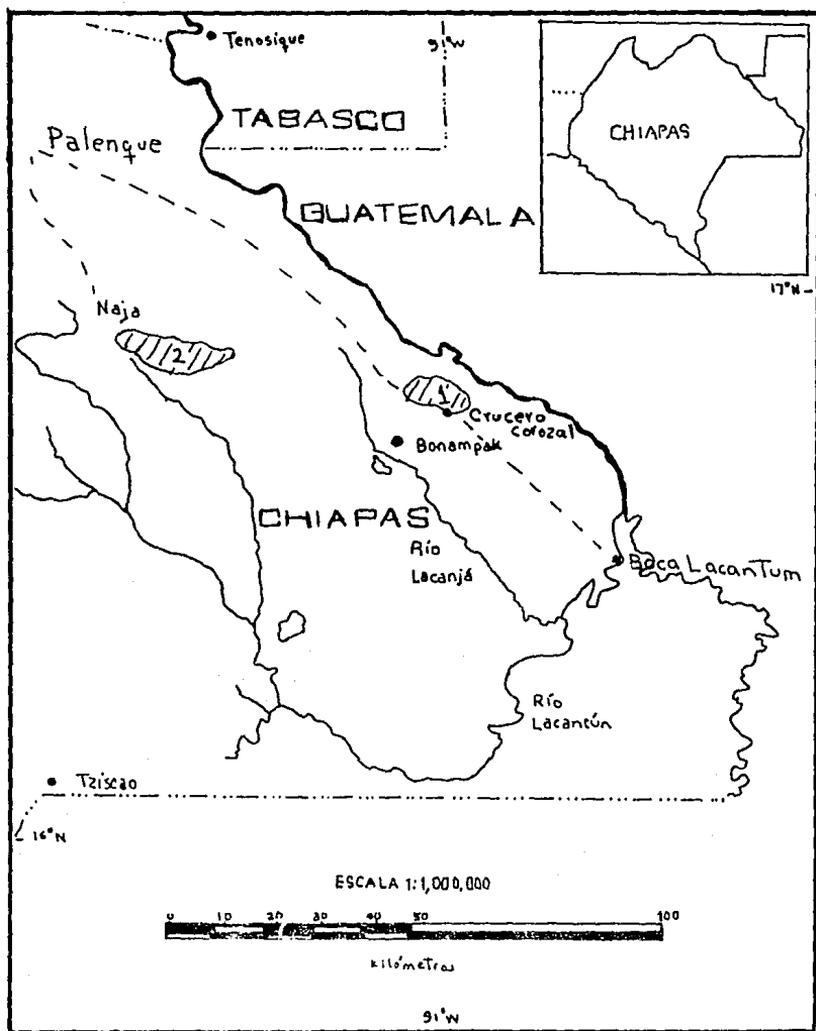


Fig 1. Localización de las especies en estudio:

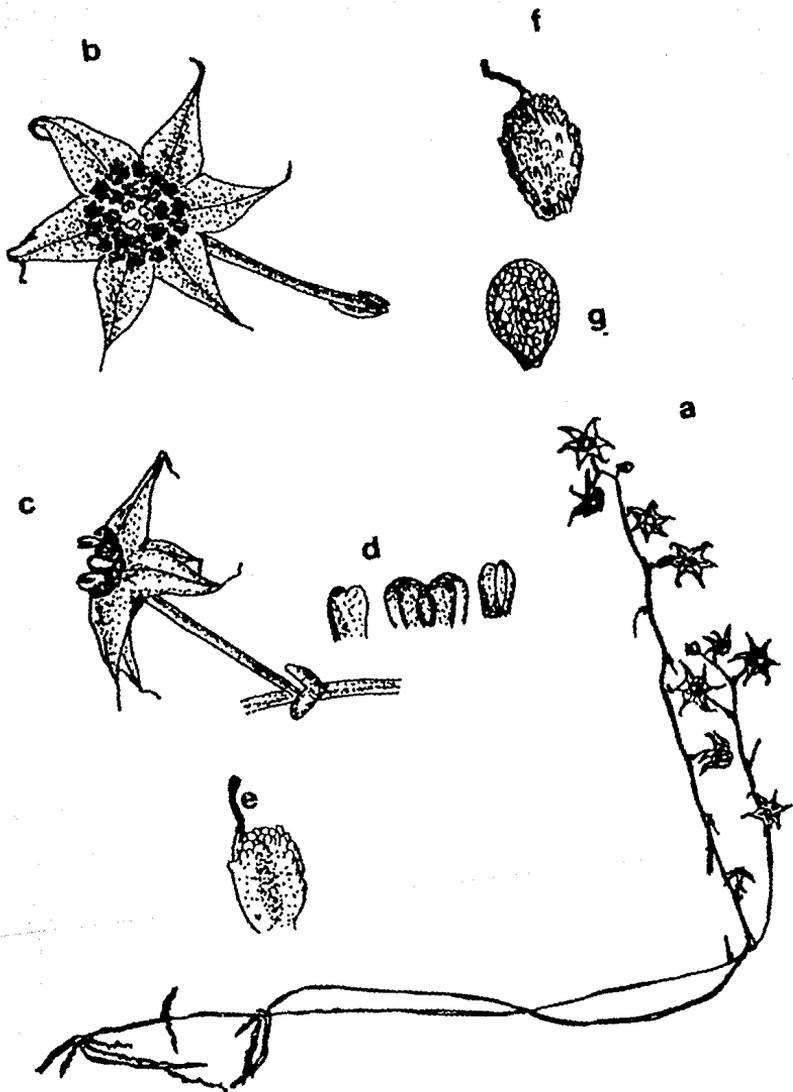
1. *Lacandonia schismatica*
2. *Triuris alata*

todo el año si las condiciones de humedad son adecuadas, es muy abundante en noviembre y diciembre después de la temporada de lluvias.

2.2 Morfología

Son hierbas saprofíticas, áfilas, blanquecinas, hasta de nueve centímetros de alto, con un rizoma horizontal de crecimiento indefinido y raíces fibrosas y pubescentes. Los tallos aéreos son simples y glabros. Presentan una inflorescencia racemosa y bracteada, tienen flores perfectas generalmente con seis tépalos densamente papilosos cada uno con una cauda linear-laminar en el ápice. El gineceo y el androceo se localizan sobre un receptáculo deprimido centralmente, con los carpelos rodeando al androceo (Fig.2). El gineceo puede tener de 60 a 80 carpelos papilosos con un estilo subapical. Generalmente presentan tres estambres centrales persistentes insertos en el borde de la depresión del receptáculo y anteras biloculares, introrsas, con una sola línea de dehiscencia longitudinal (Martínez & Ramos, 1989).

Su número cromosómico es $n=9$, el complemento cromosómico se caracteriza por cuatro pares grandes de cromosomas y cinco pares de cromosomas más pequeños (Davidse and Martínez, 1990).



2.3 Ubicación taxonómica

La nueva familia Lacandoniaceae ha sido ubicada taxonómicamente en el orden Triuridales junto a las familias Petrosaviaceae Hutchinson y Triuridaceae Gardner (Cronquist, 1981).

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia: Lacandoniaceae

Género: *Lacandonia*

Especie: *L. schismatica*

2.4 Grupos afines

Lacandoniaceae comparte con Triuridaceae los siguientes caracteres: inflorescencia racemosa, flores actinomorfas, con gineceo apocárpico, óvulos bitégmicos, solitarios, sésiles, anátropos, con el tegumento interno formando el micrópilo, androceo básicamente trímero, embrión pequeño no desarrollado inmerso en abundante endospermo celular, hábito saprofitico y micorrizas endotróficas. Sin embargo, difiere por: la disposición espacial de los órganos reproductores, con los estambres ocupando la parte central de la flor, la dehiscencia

introrsa de las anteras, extrorsa en Triuridaceae, el tapetum de tipo secretor en Lacandoniaceae, amiboideo en Triuridaceae (Quiroz, 1990). La composición de metabolitos secundarios es de glicéridos y sacáridos en *L. schismatica* y B-sitosterol, estigmasterol y dos compuestos adicionales del tipo estructural aromático que no se han identificado para *T. alata* (G. Delgado, com. pers.), se ha comenzado a describir un nuevo tipo de fecundación para *L. schismatica*, en la cual los granos de polen germinan en la antera en la flor abierta, se dirigen a los micrópilos en la misma flor y fecundan los óvulos (Márquez, 1990).

3. *Triuris alata* Brade

3.1 Distribución geográfica, hábitat y ecología

La familia Triuridaceae se presenta a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales de América, África, Asia e Indonesia (Giesen, 1938; Takhtajan, 1986). El género *Triuris* tiene dos centros de distribución. Su centro primario es en las selvas tropicales costeras al sureste de Brasil y el centro secundario es al Noroeste del Amazonas. Se encuentra también en Surinam, Guayana y Guatemala (Maas, & Rubsamen, 1986). Recientemente fue encontrada en México en la zona Lacandona, Chiapas (Gómez & Martínez, en prensa).

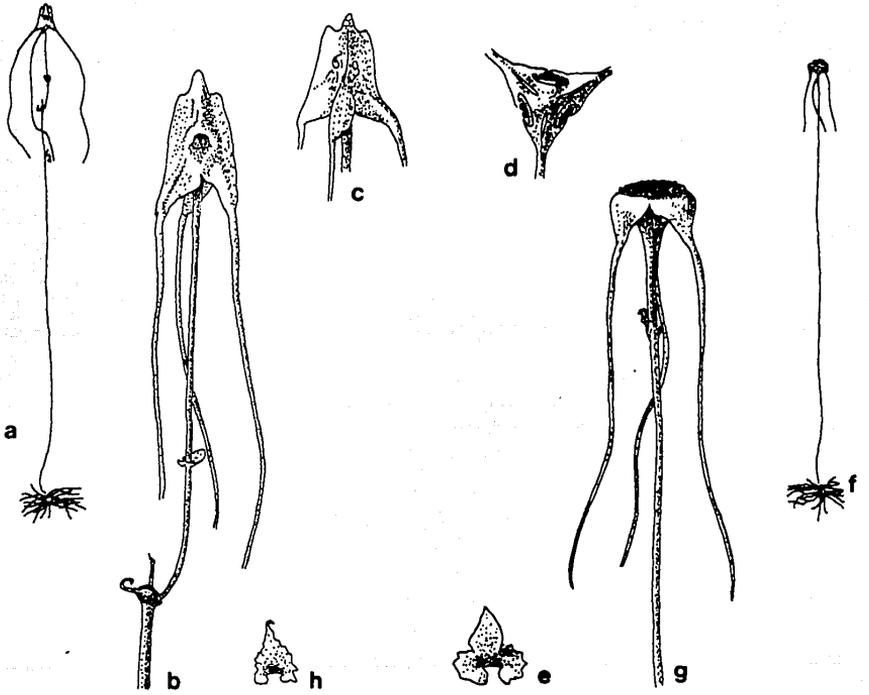
Las Triuridaceae son generalmente raras. El hábitat de ésta familia es de selvas densas y oscuras; también se encuentran en selvas periódicamente inundadas, preferentemente entre los contrafuertes y las raíces de los grandes árboles.

T. alata sólo se conoce de Brasil, Rio de Janeiro (Brade, 1943), y de México en la zona lacandona, Chiapas (Fig 1 y 3). Florece en febrero y marzo en Brasil, en México de agosto a diciembre.

3.2 Morfología

Son hierbas dioicas no ramificadas con rizomas cortos, numerosas raíces filiformes y esparcidamente pubescentes. Presentan un tallo hialino, inflorescencia racemosa con brácteas triangulares en su base, y tres tépalos caudados. Las flores estaminadas presentan tres estambres que carecen de filamentos alternando con los tépalos y se insertan en hendiduras circulares en la base de un andróforo carnoso (Fig.4). Las flores pistiladas contienen numerosos ovarios elipsoides u ovoides con un estilo terminal (Maas, & Rubsamen, 1986).





3.3 Ubicación taxonómica

Cronquist (1981), incluye dentro del orden Triuridales a las familias Petrosaviaceae y Triuridaceae. De acuerdo a la clasificación del autor la ubicación taxonómica de *T. alata* es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia: Triuridaceae

Género: *Triuris*

Especie: *T. alata*

3.4 Grupos afines

Cronquist (1981) considera que "Triuridaceae es una familia taxonómicamente aislada y que además de su probable relación con la pequeña familia Petrosaviaceae, difiere agudamente de todos los demás grupos (Fig.5). Los carpelos separados, más o menos numerosos, sugieren que la familia Triuridaceae está asociada con las de la subclase Alismatidae. El polen trinucleado es compatible con tal asociación, pero el hábito micotrófico,

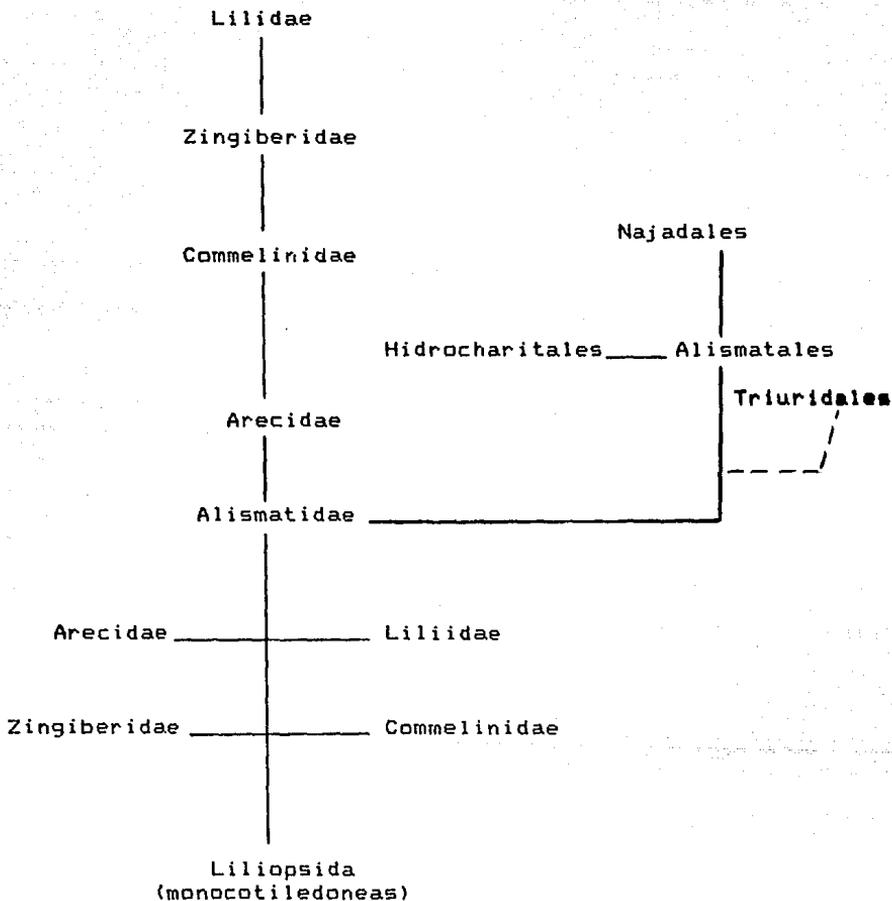


Fig. 5. Relaciones filogenéticas entre las subclases de Liliopsida (monocotiledoneas) y entre los órdenes de la subclase Alismatidae a la cual pertenecen *Lacandonia schismatica* y *Triuris alata*, (Cronquist, 1981).

terrestre y el endospermo de las semillas bien desarrollado no está en armonía con los otros órdenes de la subclase", y comenta que "eventualmente podría ser necesario constituir a Triuridales como una subclase distinta, pero con el presente estado de conocimientos no pienso que sea útil".

Petrosaviaceae comparte con Triuridaceae: el hábito saprofítico y micorrizas endotróficas, óvulos bitégmicos y anátropos así como una extraordinaria semejanza en la estructura anatómica del tallo, raíz y hojas, pero difiere por presentar estomas, tépalos en dos series, carpelos fusionados basalmente con muchos óvulos y anteras con dehiscencia introrsa, extrorsa en Triuridaceae. Las características afines de Triuridaceae y Lacandoniaceae ya han sido mencionadas en el apartado 2.4 de este trabajo.

El estudio comparativo del núcleo celular interfásico de las familias que conforman el orden triuridales aportará conocimientos para su ubicación taxonómica más precisa.

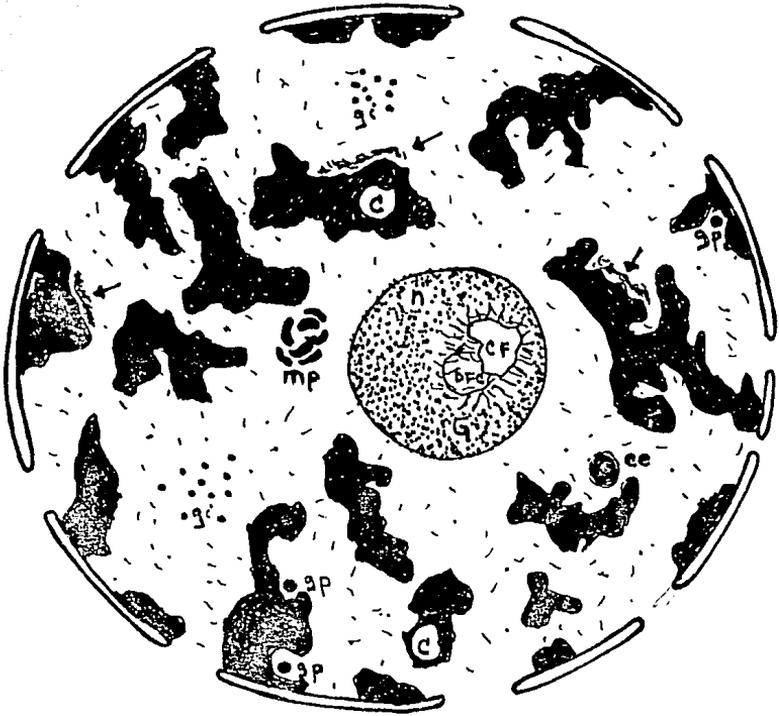
4. Núcleo celular interfásico vegetal

La célula eucarionte contiene numerosos compartimientos que consisten de organelos limitados por membranas. De estos organelos el más característico es el núcleo, un rasgo esencial de todas las células animales y vegetales. El de animales ha sido ampliamente estudiado y gran parte del conocimiento que de él se tiene se ha generado por estudios con aves y mamíferos. Por el contrario, poca es la información que se posee sobre la naturaleza y organización de los diferentes componentes estructurales de este organelo en las plantas. En interfase consta de diversos componentes que pueden ser agrupados molecular y ultraestructuralmente en cuatro categorías: a) componentes fosfolipídicos, b) componentes proteicos, c) componentes desoxirribonucleicos y d) componentes ribonucleicos (en Aguilar, 1990) (Fig 6).

a) Componentes fosfolipídicos

- Envoltura nuclear

Consiste de dos membranas de 50 a 70 Å de grosor entre las cuales se encuentra el espacio perinucleolar o cisterna de 200 Å aproximadamente. La envoltura nuclear posee ribosomas en su membrana externa y es continua con el retículo endoplásmico (en Alberts y col., 1989).



La presencia de una envoltura nuclear es el rasgo distintivo de la célula eucarionte. Su función está relacionada con el rasgo fundamental de la organización eucarionte que es la separación de la transcripción de la traducción (en de Robertis y de Robertis, 1983). La posesión de una barrera entre la transcripción y la traducción ha permitido el desarrollo de una serie de procesos reguladores relacionados con la expresión de los genes.

b) Componentes proteicos

- Complejo de poro

La membrana externa e interna de la envoltura nuclear está interrumpida por poros nucleares. Estos y sus componentes no membranosos asociados tienen una arquitectura altamente organizada. Su localización y estructura sugieren un papel muy importante en la vida de la célula eucarionte; parece ser que están involucrados en el intercambio de materiales entre el núcleo y el citoplasma.

Las paredes membranosas del poro se forman por fusión de las membranas nucleares externa e interna. El complejo de poro está compuesto de un lumen de forma circular de 700 Å de diámetro, revestido por tres anillos. Cada uno de estos anillos está

compuesto de ocho subunidades embebidas en una matriz. Es característico del complejo de poro la presencia de un gránulo central. La parte central del poro es el canal para el transporte de productos nucleares de varios tipos. Otro rasgo del complejo de poro es la presencia de varias fibrillas entre el gránulo central y las estructuras periféricas.

- Lámina densa

Es una capa de material fibroso estrechamente unida a la cara interna de la envoltura nuclear, contiene proteínas especializadas que forman los poros en la envoltura nuclear (Franke, 1987). Se cree que desempeña un papel importante en la organización de la envoltura nuclear y de la cromatina subyacente.

- Matriz nuclear

La matriz nuclear está compuesta por la lámina densa, el complejo de poro, residuos del nucleolo, y una red fibrogranular interna, la cual comprende los gránulos intercromatinianos que se presentan como partículas individuales o en cúmulos (Berezney, 1979; Krzyzowska-Gruca et al., 1983). Esta estructura puede obtenerse tratando núcleos aislados con detergentes, nucleasas y altas concentraciones de sales.

c) Desoxirribonucleoproteínas

-Cromatina

La cromatina está compuesta de fibrillas y éstas a su vez están compuestas de unidades estructurales repetitivas llamadas nucleosomas. Cada nucleosoma está compuesto de un glóbulo de histonas alrededor del cual se enrolla el ácido desoxirribonucleico (ADN). En el caso de la cromatina que no está en transcripción o replicación se ha propuesto que cada nucleosoma comprende una corta extensión de ADN que contiene cerca de 200 pares de bases asociados con dos moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (octámero de histonas) y una molécula de H1 (en Alberts y col., 1989).

Los constituyentes químicos de la cromatina son tres: DNA, histonas y proteínas nucleares ácidas. Las histonas se pueden clasificar en cinco grupos con base a su contenido de lisina y arginina: a) las histonas muy ricas en lisina H1; b) las histonas con poca lisina, H2A; c) las histonas moderadamente ricas en lisina, H2B; d) y e) las histonas ricas en arginina H3 y H4. Los cinco grupos se han detectado en la cromatina de las plantas (Jordan y colaboradores, 1980). Se considera que las cuatro últimas histonas mencionadas se encuentran entre las más conservadas durante la evolución de todas las proteínas conocidas.

En el núcleo celular interfásico se observan varios grados de condensación de la cromatina. Las áreas de cromatina densa son inactivas en la síntesis de (ARN), las áreas de cromatina laxa pueden estar asociadas con altas tasas de síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y contienen partículas ribonucleoproteicas (en Alberts y col., 1989).

El arreglo de la cromatina puede presentar dos aspectos; el patrón reticulado donde se observan numerosas bandas de cromatina densa entremezcladas con regiones de cromatina laxa, fibrillas y gránulos (Fig 6), y el patrón cromocéntrico que presenta grumos periféricos de cromatina densa llamados cromocentros. Es posible que no haya grandes diferencias entre el núcleo reticulado y cromocéntrico, porque se ha observado que en diferentes estados metabólicos el núcleo de algunas plantas adquiere una estructura interna diferente. Las plantas que presentan núcleos reticulados tienen en general cromosomas muy largos así como más ADN por cromosoma y más ADN por célula que los núcleos cromocéntricos (Jordan y colaboradores, 1980).

d) Ribonucleoproteínas

En el interior del compartimiento formado por las membranas se encuentra una variedad de elementos estructurales ribonucleoproteicos que exhiben una composición molecular

compleja y median funciones celulares importantes. El nucleoplasma del núcleo celular interfásico contiene varias estructuras ribonucleoproteicas las cuales pueden ser fácilmente evidenciadas con la técnica de Bernhard (1969). La mayoría de estas estructuras parecen estar involucradas en una de las dos funciones más importantes del núcleo: la síntesis y procesamiento del ácido ribonucleico (ARN).

El organelo nuclear más conspicuo es el nucleolo, el cual puede ser considerado el componente ribonucleoproteico más complejo y altamente ordenado en eucariontes. Morfológicamente está compuesto de los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, la región fibrilar y la región granular. Su función es la síntesis y procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de partículas prerribosómicas (en Jiménez García, 1988).

Los centros fibrilares son regiones claras a los electrones, cuando se observan con las técnicas habituales para microscopía electrónica, contienen fibras de aproximadamente 50 Å de espesor, probablemente pertenecientes a la cromatina de los organizadores nucleolares (NORs). Contienen los genes ribosómicos (rDNA 18s, 5.8s, 28s), la RNA polimerasa I, las proteínas del organizador nucleolar que se tiñen con plata (proteínas AG-NOR), fibrilarina y las fosfoproteínas C23 y B23 y pueden ser el sitio donde tiene lugar la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del

pre-rRNA (en Jiménez García, 1988).

La región granular presenta gránulos de 150 a 200 A de diámetro y representa el sitio de procesamiento más tardío, maduración y almacenamiento de prerribosomas (en Jiménez García, 1988).

En algunos nucleolos puede existir una región fibrogranular o nucleolonema en la que se mezclan las fibras de 40 a 80 A de espesor y 200 a 400 A de longitud, con los gránulos de 150 a 200 A de diámetro. Rodeando al nucleolo se encuentra una cubierta de cromatina perinucleolar (PNC) la cual no se considera un constituyente nucleolar. Ocasionalmente penetran en el nucleolo fibras delgadas que parten de la cromatina perinucleolar y probablemente tengan conexión con los centros fibrilares (en Jiménez García, 1988).

Las fibras pericromatinianas (FPC) fueron descritas por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969. Inmediatamente después de su síntesis se observan en el borde de la cromatina densa y parecen corresponder al hnRNA unido a proteínas en forma de estructuras ribonucleoproteicas fibrilares estrechamente relacionadas con el borde de la cromatina densa donde existe cromatina laxa y semicompacta. De manera progresiva estas fibras migran al espacio intercromatiniano donde se entremezclan con cromatina dispersa (Puvion and Moyne, 1978).

Trabajos autorradiográficos y citoquímicos demuestran que la transcripción del hnRNA se lleva a cabo en el borde de la cromatina densa y que las fibras pericromatinianas son las primeras estructuras ribonucleoproteicas marcadas en el área extranucleolar de los núcleos celulares interfásicos de mamíferos (Puvion and Moyne., 1978).

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por vez primera por Watson en 1962 y su naturaleza ribonucleoproteica quedó establecida definitivamente por Monneron y Bernhard en 1969. Son partículas esféricas de 300-500 A de diámetro, compuestas de fibras densamente empaquetadas, se localizan en la periferia de la heterocromatina compacta y rara vez se observan aislados en el área intercromatiniana. Resisten la digestión con RNasa pero la extracción secuencial con proteasa y RNasa decrece su contraste o los destruye completamente (Monneron y Bernhard, 1969). Datos autorradiográficos y citoquímicos sugieren que se forman por el enrollamiento de las fibras pericromatinianas durante el proceso de transcripción y que corresponden a formas de almacenamiento del hnRNA recién sintetizado (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Estudios recientes demuestran que estos gránulos contienen RNA mensajero maduro, que ya ha sufrido el proceso de pérdida de los intrones (Vázquez-Nin y col., 1990).

Swift en 1963, describe los gránulos intercromatinianos como partículas pequeñas, densas, irregulares, de 200-250 A de

diámetro que se presentan en cúmulos interconectados por finas fibrillas formando una red en las regiones intercromatinianas del núcleo. Monneron y Bernhard en 1969 comprobaron su naturaleza ribonucleoproteica. Se pueden encontrar transiciones entre fibrillas y gránulos intercromatinianos.

Los gránulos intercromatinianos son estructuras morfológicamente bien definidas del núcleo celular animal, sin embargo sus funciones en el metabolismo nuclear no están bien definidas. El grado de conocimiento de estas partículas es menor aún en los núcleos de plantas. Estudios citoquímicos demuestran que contienen grandes cantidades de proteínas fosforiladas (Wassef, 1979). Son componentes de la matriz nuclear (Berezney, 1979; Krzyzowska-Gruca et al., 1983). Spector et al, en 1983 y más claramente Fakan y colaboradores en 1984 encontraron por inmunolocalización y análisis ultraestructural que contienen snRNPs, partículas relacionadas con la maduración del pre-mRNA. Medina y colaboradores en 1989, demostraron mediante estudios citoquímicos que los gránulos de 20-25 nm detectados en el espacio intercromatiniano en los núcleos de plantas son homólogos a los gránulos intercromatinianos de las células animales. Sin embargo, difieren de éstos por no formar grandes cúmulos.

Los micropuffs o cent-ómeros (Risueño et al., 1978; Church and Moens, 1976), son estructuras formadas por una red de fibras

ribonucleoproteicas que se tiñen con la técnica de Bernhard, son sensibles a la ribonucleasa y están inmersas en una matriz proteica con características citoquímicas similares a las de los componentes nucleolares. Pueden estar cercanos al nucleolo o en el nucleoplasma (Risueño et al., 1978).

Los micronucleolos o cariosomas y los cuerpos nucleares densos son característicos del núcleo vegetal. Son estructuras de 0.5 a 1µm, generalmente se encuentran adyacentes al nucleolo pero se desconoce su función (en Jordan y colaboradores, 1980).

Los cuerpos espiralados, caracterizados por Monneron y Bernhard en 1969, son estructuras nucleares esféricas formadas por un agregado de espirales cortas. Su densidad a los electrones varía de poca a muy alta. Se piensa que están compuestos de RNA y proteínas. En ocasiones se encuentran cercanos al nucleolo o a la envoltura nuclear pero principalmente se encuentran en los espacios intercromatinianos. Los cuerpos espiralados se encuentran presentes en las especies animales y en las células somáticas de las plantas (Moreno Diaz de la Espina et al., 1982; Schultz, 1989).

III. Objetivos

Los objetivos particulares del presente trabajo son:

- 1) Describir la morfología general del núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* y *Triuris alata*, mediante la aplicación de técnicas de microscopía óptica (reacción de Feulgen y azul de toluidina).
- 2) Describir la ultraestructura del núcleo celular interfásico de ambas especies, mediante técnicas convencionales para microscopía electrónica (acetato de uranilo-citrato de plomo).
- 3) Caracterizar parcialmente las partículas ribonucleoproteicas (RNPs), de ambas especies empleando la tinción preferencial para ribonucleoproteínas descrita por Bernhard (1969).
- 4) Comparar la organización nuclear de ambas especies.

IV. Metodología

En el presente trabajo se estudió material de dos colectas de *L. schismatica* (E. Martínez S. no. 24519 y 24508 MEXU), y dos de *T. alata* (E. Martínez S. no. 24510 y 24522 MEXU). Se procesaron muestras de botones florales y flores en diferentes etapas de desarrollo de acuerdo a la siguiente metodología (Fig. 7):

Se utilizaron dos fijadores: glutaraldehído 2.5% en buffer de fosfatos 0.2M a pH 7.2 y glutaraldehído 2%/Paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.2M; pH 7.2. Algunas muestras se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% (OsO_4) por 24 horas. En algunos casos las muestras fueron fijadas en el sitio mismo de colecta para continuar su procesamiento en el laboratorio. En otros casos la planta fue colectada y transportada viva al laboratorio donde se iniciaron los procesos desde la fijación. Las estructuras florales fueron seccionadas en pequeñas fracciones dentro de la solución fijadora. Esta se sometió al vacío por 2 minutos, los tejidos fijados en campo estuvieron en contacto con el fijador 2 ó 3 días. Las muestras fijadas en el laboratorio tuvieron un tiempo de fijación de 2 horas.

Las muestras se lavaron tres veces por cinco minutos con buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 para eliminar el exceso de fijador. Se procedió a deshidratar las muestras con alcoholes graduales del

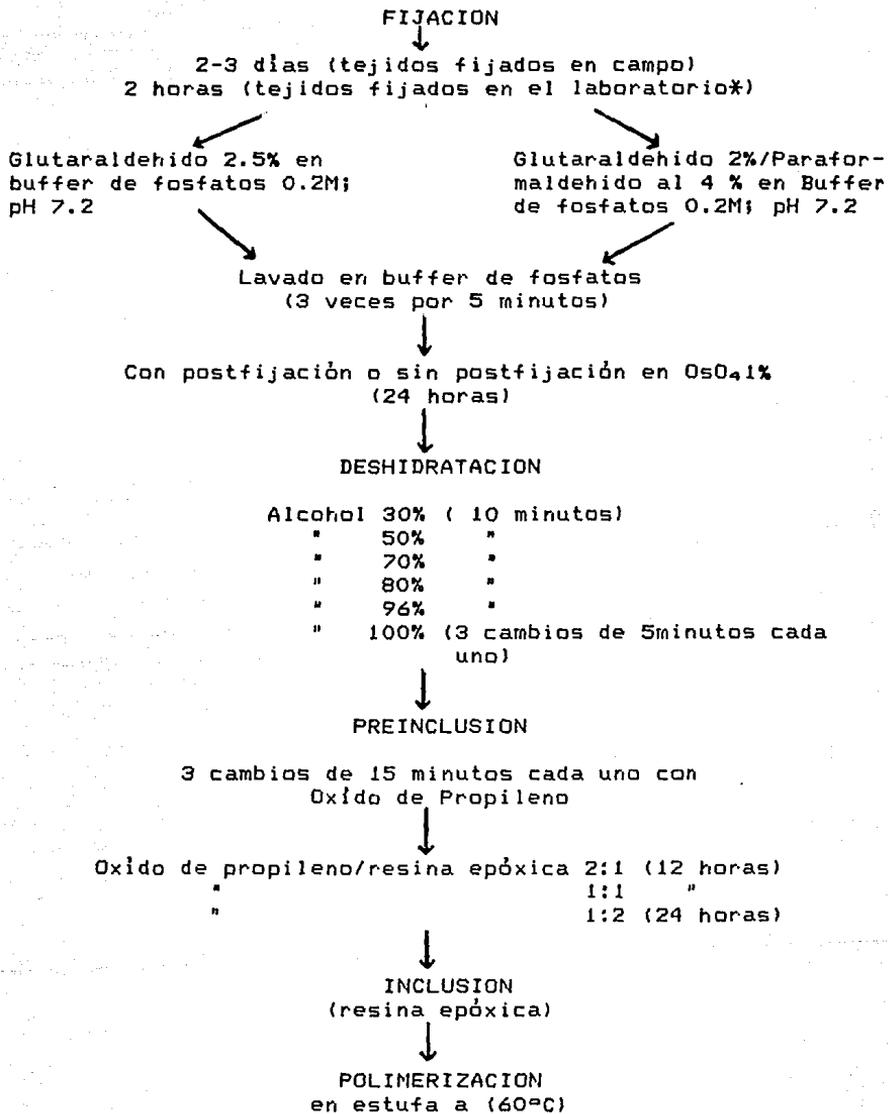


Fig 7. Diagrama de flujo

* 2 minutos al vacío

30, 50, 70, 80 y 96% con un tiempo de duración de 10 minutos cada uno y tres cambios de 5 minutos cada uno con alcohol absoluto. Se hicieron tres cambios de 15 minutos con óxido de propileno cada uno (C_3H_6O), después de lo cual las muestras se colocaron en una mezcla homogénea de óxido de propileno/resina epóxica en una proporción 2:1 por 12 horas; posteriormente en una mezcla óxido de propileno/resina epóxica 1:1 por 12 horas y por último se colocaron las muestras en una mezcla homogénea de óxido de propileno/resina epóxica por 24 horas. Las muestras se incluyeron en una resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a (60°C).

MICROSCOPIA OPTICA

Se obtuvieron cortes semifinos de 150 a 240 nm de grosor del botón floral en un ultramicrotomo MT1 (Sorvall). En algunos cortes se aplicó la técnica específica para ácido desoxirribonucleico o reacción de Feulgen (Feulgen-Schiff) en la cual los tejidos fijados se sometieron a una hidrólisis ácida con HCl 1N a 60°C para liberar los grupos aldehídos del azúcar desoxirribosa del ADN y posteriormente los se lavaron con agua destilada y se transfirieron a una solución de reactivo de Schiff, el cual reacciona con los grupos aldehídos expuestos, produciendo una tinción púrpura solamente en la cromatina nuclear.

Por otra parte algunos cortes semifinos de tejidos fijados se tiñeron con azul de toluidina. Las preparaciones obtenidas se observaron en un microscopio óptico Zeiss a $\times 500$.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de grosor de células del tegumento de *L. schismatica* y de células del receptáculo de *T. alata* en un ultramicrotomo MT1 (Sorvall) y se montaron en rejillas de cobre.

Se utilizó la técnica convencional para microscopía electrónica de acetato de uranilo/citrato de plomo y la técnica regresiva y preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) de Bernhard (1969).

Técnica convencional para microscopía electrónica.

La tinción convencional se llevó a cabo en una cámara húmeda de acuerdo a la siguiente metodología:

a. *L. schismatica*: Las rejillas se contrastaron por flotación sobre una solución de acetato de uranilo por 5 minutos, se enjuagaron con agua bidestilada y se contrastaron posteriormente con citrato de plomo por 2 minutos.

b. 7. *alata*: Se utilizó el mismo procedimiento pero con tiempos más largos de ambos contrastantes: 20 minutos de acetato de uranilo y 10 minutos de citrato de plomo.

Técnica regresiva al EDTA de Bernhard, preferencial para RNPs.

a. *L. schismatica*: las rejillas se contrastaron por flotación sobre una solución de acetato de uranilo por 5 minutos; se enjuagaron con agua bidestilada, posteriormente se colocaron sobre una gota de solución de EDTA 0.2M pH 6.8 de 45 a 50 minutos; se enjuagaron y por último se contrastaron con citrato de plomo por 2 minutos.

b. 7. *alata*: se utilizó el mismo procedimiento pero con tiempos más largos de tratamiento con EDTA y citrato de plomo: 5 minutos de acetato de uranilo; 2 horas con EDTA 0.2M; se enjuagaron con agua bidestilada y se contrastaron con citrato de plomo por 4 minutos.

Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80Kv.

Morfometría

Las mediciones del diámetro de los gránulos se realizaron en micrografías electrónicas de núcleos de células del tegumento de *L. schismatica* y núcleos de células del receptáculo de *T. alata*, contrastados con la técnica preferencial para RNPs. El aumento total de las micrografías electrónicas analizadas fué igual o mayor a X 25,000. Se seleccionaron para su medición, gránulos bien definidos. La medición se llevó a cabo con una lupa graduada en décimas de milímetros. Posteriormente se convirtieron estas unidades a nanómetros. Se midieron un total de 1000 gránulos de 50 núcleos provenientes de diferentes organismos. Los datos se analizaron estadísticamente con un programa desarrollado por el Dr. Vázquez-Nin del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

V. Resultados

Microscopía Óptica

La tinción con azul de toluidina reveló la estructura general de los núcleos interfásicos de *L. schismatica* y de *T. alata*. Ambas especies presentan núcleos reticulados, característicos de muchas monocotiledóneas. Las estructuras más conspicuas a este nivel son los nucleolos y los grumos de cromatina condensada, éstos últimos son los responsables de la apariencia reticulada del núcleo. Sin embargo, no es posible visualizar con detalle estas estructuras ni observar las que se encuentran presentes en las regiones intercromatinianas.

La tinción específica para ácido desoxiribonucleico (reacción de Feulgen-Schiff) es positiva en *L. schismatica* y *T. alata* para la red observada en el nucleoplasma produciéndose una tinción púrpura solamente en el retículo de cromatina. El nucleolo no se contrasta con esta técnica.

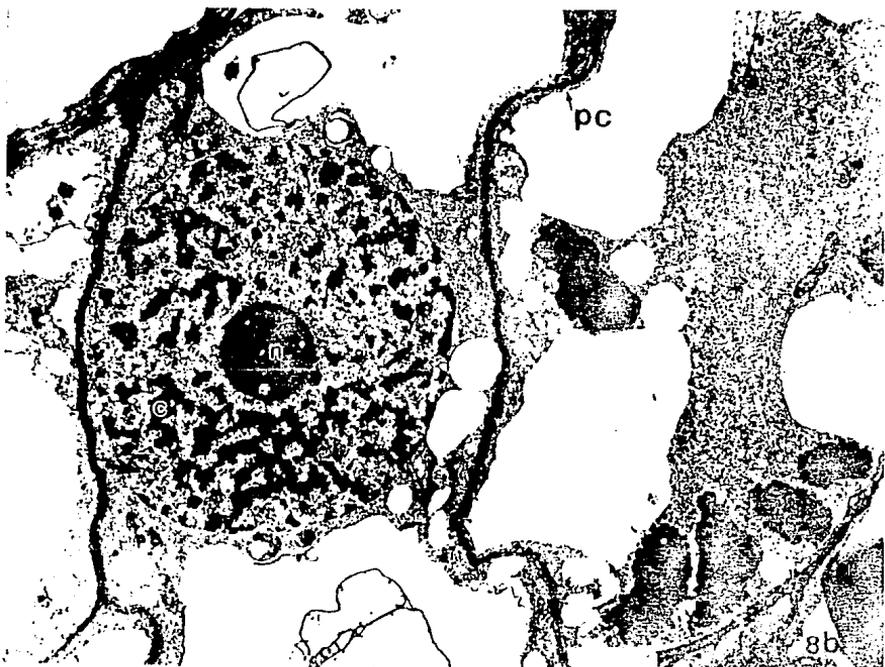
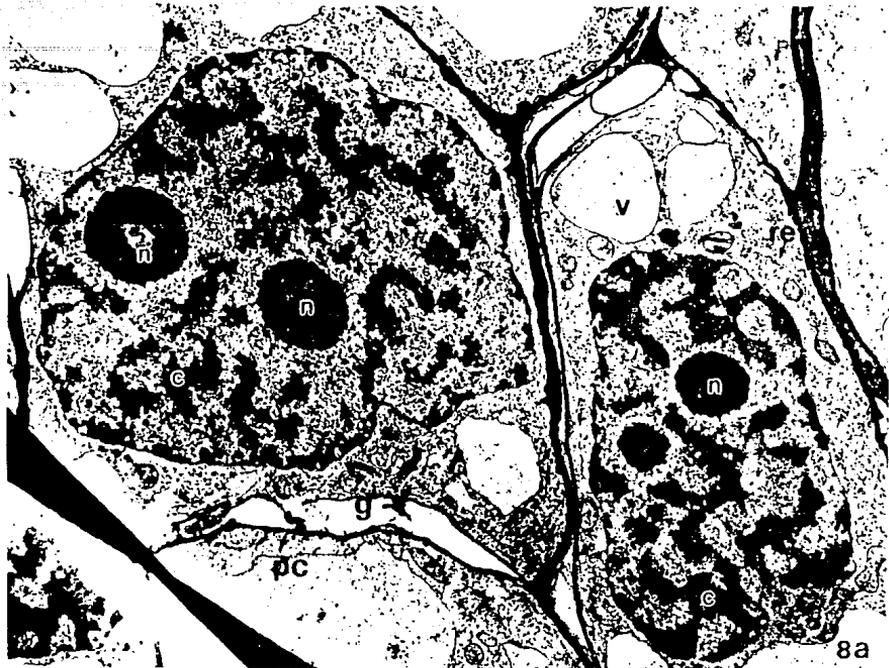
Microscopía Electrónica

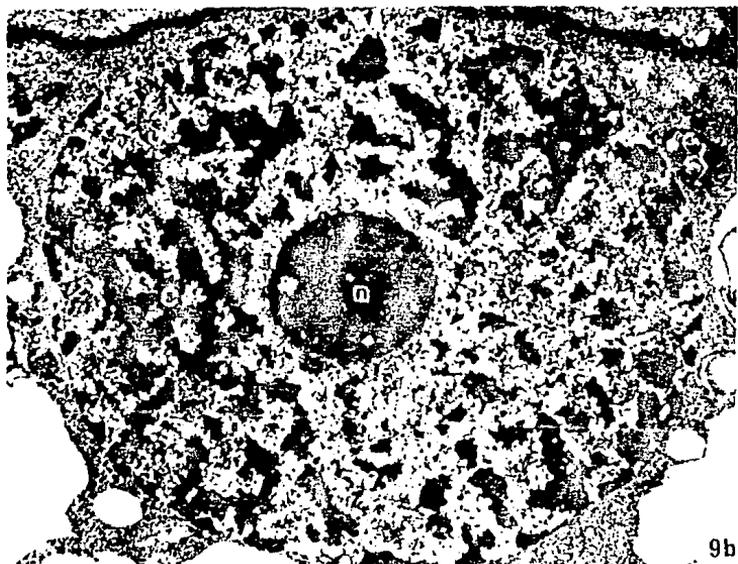
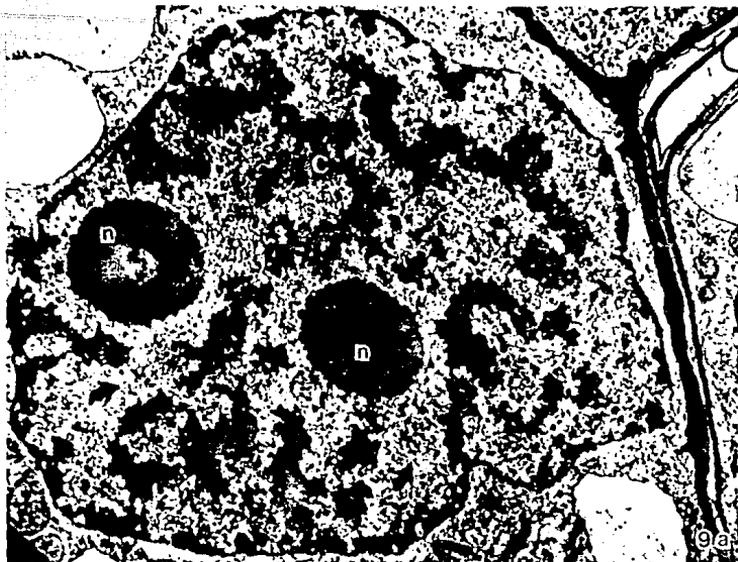
Técnica Convencional

Con la fijación de glutaraldehído 2%/Paraformaldehído 4% se obtuvo una buena preservación del núcleo celular de ambas especies (Fig 8a y 8b), así como del citoplasma celular, del cual es posible observar: el complejo de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas y la pared celular que delimita las células vegetales, en los núcleos de las células del tegumento de *L. schismatica* y en los núcleos de células del receptáculo de *T. alata* postfijadas con tetraóxido de osmio.

Después de la doble fijación y de la tinción subsecuente con acetato de uranilo y citrato de plomo, los núcleos de *L. schismatica* y *T. alata* mostraron un patrón reticulado con cuatro regiones claramente definidas: la envoltura nuclear, el nucleolo, los grumos de cromatina compacta y las regiones intercromatiniana y pericromatiniana (Fig 9a y 9b).

Los componentes nucleoplasmáticos están delimitados por una doble membrana interrumpida ocasionalmente por la presencia de poros nucleares (Fig 10a). La lámina densa está adosada a la cara interna de la envoltura nuclear. La membrana externa está rodeada por ribosomas (fig 13) con un diámetro similar al





Microscopía Electrónica

Técnica Convencional

Con la fijación de glutaraldehído 2%/Paraformaldehído 4% se obtuvo una buena preservación del núcleo celular de ambas especies (Fig 8a y 8b), así como del citoplasma celular, del cual es posible observar: el complejo de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas y la pared celular que delimita las células vegetales, en los núcleos de las células del tegumento de *L. schismatica* y en los núcleos de células del receptáculo de *T. alata* postfijadas con tetraóxido de osmio.

Después de la doble fijación y de la tinción subsecuente con acetato de uranilo y citrato de plomo, los núcleos de *L. schismatica* y *T. alata* mostraron un patrón reticulado con cuatro regiones claramente definidas: la envoltura nuclear, el nucleolo, los grumos de cromatina compacta y las regiones intercromatiniana y pericromatiniana (Fig 9a y 9b).

Los componentes nucleoplasmáticos están delimitados por una doble membrana interrumpida ocasionalmente por la presencia de poros nucleares (Fig 10a). La lámina densa está adosada a la cara interna de la envoltura nuclear. La membrana externa está rodeada por ribosomas (fig 13) con un diámetro similar al

Fig. 8a. Micrografía electrónica de dos células del tegumento de *Lacandonia schismatica*, fijadas con glutaraldeído 2% / paraformaldehído 4% y postfijadas en osmio. En el citoplasma se observan a bajos aumentos el complejo de Golgi (g); vacuolas (v); retículo endoplásmico (re) y la pared celular (pc). El núcleo presenta un retículo de cromatina (c), nucleolos compactos (n); y abundantes partículas en el nucleoplasma (flechas). Aumento X 7,200.

Fig. 8b. Micrografía electrónica de dos células del receptáculo de *Triuris alata*, fijadas con glutaraldehído 2% / Paraformaldehído 4%, sin postfijación en osmio. A la izquierda una célula en interfase y a la derecha una célula en mitosis. Se observan abundantes partículas en el nucleoplasma (flechas gruesas). Cromatina (c); nucleolo (n); cromosomas (cr). Aumento X 5,500.

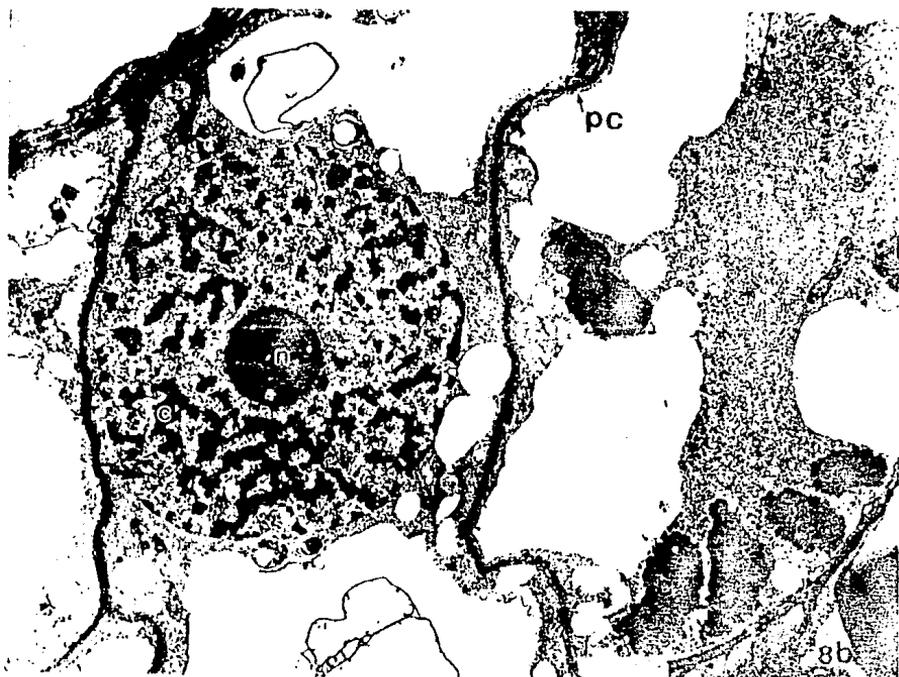
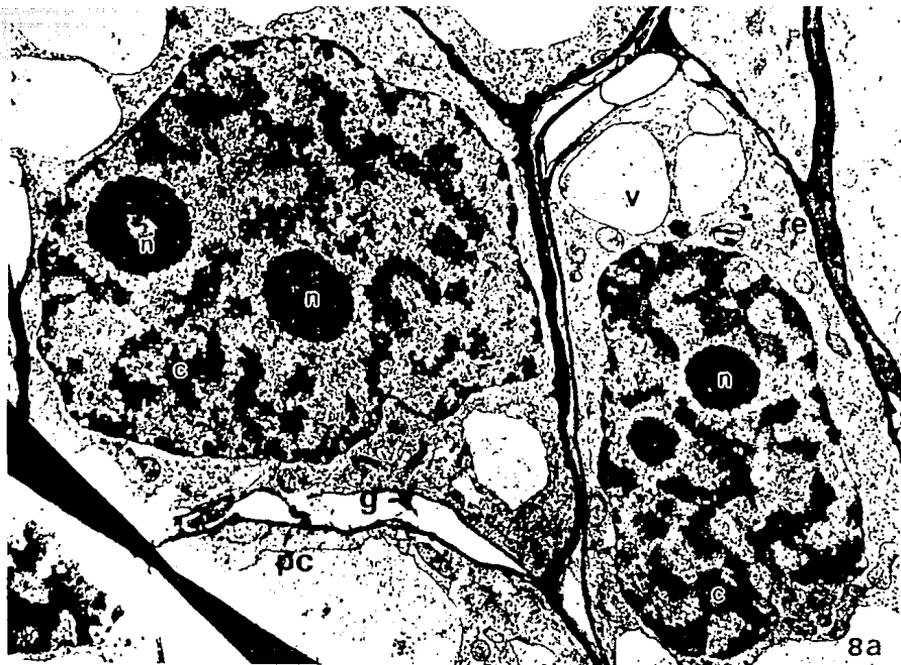


Fig. 9. Núcleos de células del tegumento de *Lacandonia schismatica* (a) y núcleos de células del receptáculo de *Triuris alata* (b) a bajos aumentos, teñidos con acetato de uranilo-citrato de plomo, con (a) o sin (b) postfijación en osmio. Presentan un retículo de cromatina (c); uno o dos nucleolos esferoidales compactos (n) y abundantes acúmulos de gránulos entre la cromatina reticulada. Aumento (a) X 10,000.

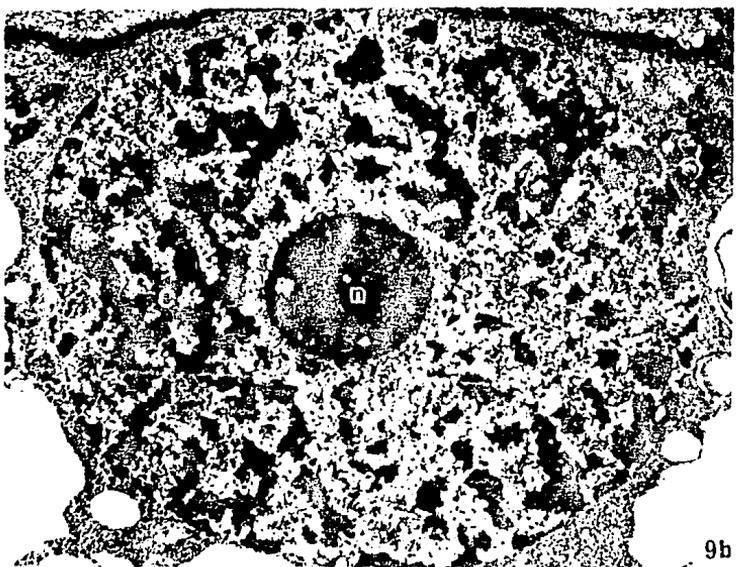
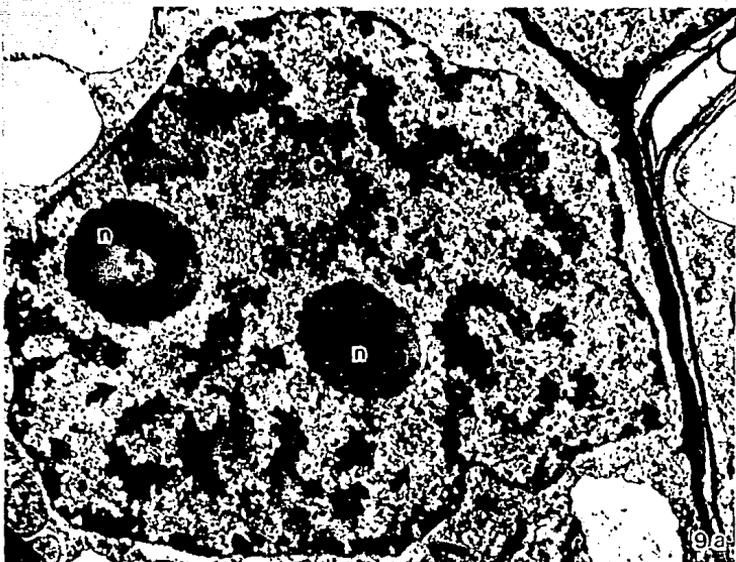
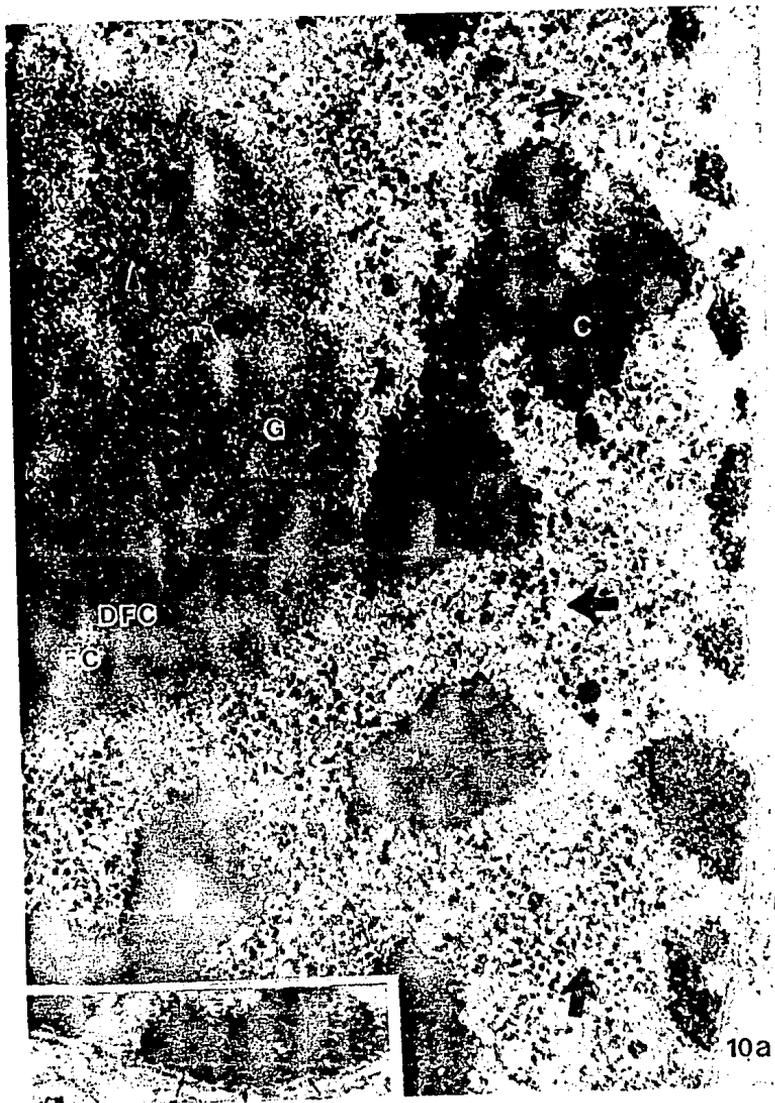
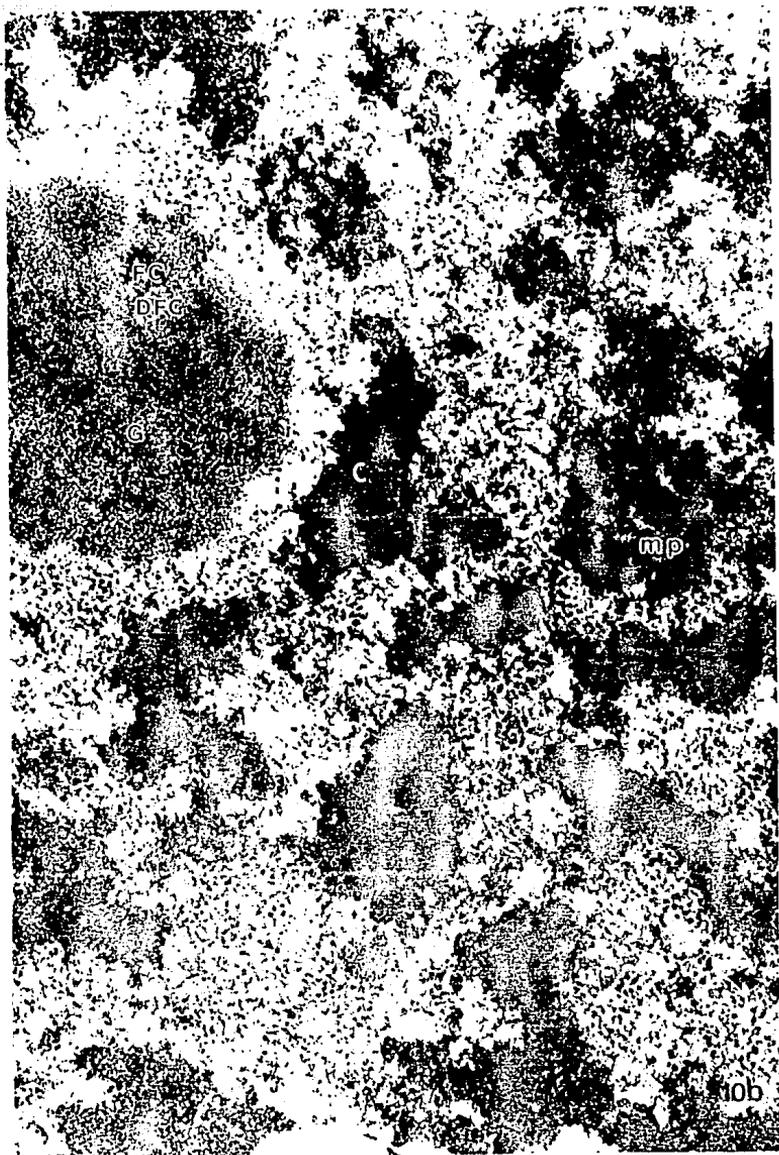


Fig.10a. Micrografía electrónica que muestra la estructura general de un núcleo de célula de raíz de *Lacandonia schismatica* teñido con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se observa la envoltura nuclear y los poros. Cúmulos de abundantes gránulos en el espacio interecromatiniano (flechas). En el nucleolo esférico compactado se observa: el centro fibrilar (FC); el componente fibrilar denso (DFC); y el componente granular (G). Aumento X 44,500. El recuadro muestra la lámina densa unida a la cara interna de la envoltura nuclear. Aumento X 73,500.

Fig.10b. Estructura general del núcleo de una célula del receptáculo de *Triuris alata*. Esta especie comparte con *Lacandonia schismatica* la presencia de abundantes gránulos en el espacio inter y pericromatiniano (flechas) los cuales son el rasgo distintivo de ambas especies. Se observa la cromatina reticulada (c). El nucleolo esférico compacto con un componente granular (G), un componente fibrilar denso (DFC) y el centro fibrilar (FC). Micropuff (mp). Tinción con acetato de uranilo-citrato de plomo. Aumento X 35,000.





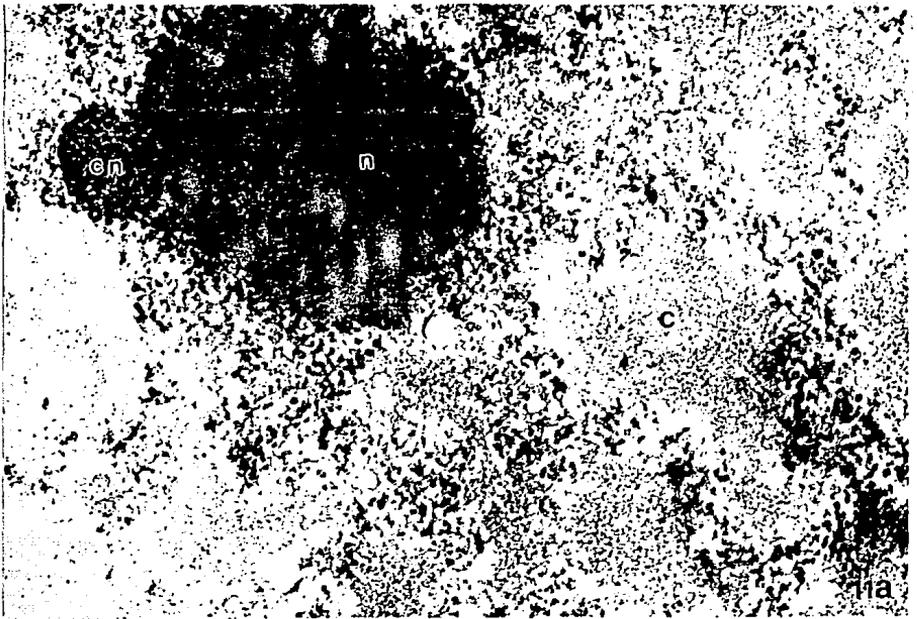
descrito por de Robertis y de Robertis (1983), así como por el complejo de Golgi.

Los nucleolos son esferoidales en ambas especies, muy compactados, con un componente débilmente contrastado que corresponde a los centros fibrilares, un componente granular predominante y un componente fibrilar denso menos abundante. El nucleolo puede presentar zonas de gránulos entremezclados con fibras. La cromatina compacta forma una red en forma de malla que es la responsable del patrón reticulado observado y corrobora las observaciones realizadas al microscopio óptico (Fig 10a y 10b).

Tinción preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs)

Después de la tinción regresiva (Fig 11a y 11b), los nucleolos de *L. schismatica* y *T. alata* aparecieron fuertemente contrastados excepto en los centros fibrilares (Fig 11b), mientras que los grumos de cromatina densa fueron blanqueados. Las estructuras ribonucleoproteicas extranucleolares se pusieron de manifiesto con la técnica de EDTA. En el borde de la cromatina compacta es común la observación de fibras pericromatinianas EDTA positivas entremezcladas con gránulos (Fig 14e). El espacio intercromatiniano y pericromatiniano de ambas especies se caracteriza por presentar cúmulos de abundantes

Fig. 11. Núcleos del tegumento de *Lacandonia schismatica* (a) y *Triuris alata* (b) teñidos con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. El rasgo distintivo de ambas especies son los acúmulos de abundantes gránulos EDTA positivos en el espacio intercromatiniano (flechas). La cromatina compacta blanqueada (c); el nucleolo (n) bien contrastado excepto en los centros fibrilares (FC). Es notable la presencia de cúmulos de abundantes gránulos invadiendo la región inter y pericromatiniana (flechas). Cuerpo nucleolar (cn). Aumento en (a) X 48,000. Aumento en (b) X 41,500.



gránulos EDTA positivos (Fig 12b y 12d), interconectados por finas fibras (Fig 13). El tamaño de los gránulos es mayor al de los ribosomas adosados a la cara externa de la envoltura nuclear (Fig 13).

El diámetro de los gránulos es de 32 ± 3 nm en promedio en *L. schismatica* y de 31 ± 2 nm en promedio en *T. alata*. No hay diferencia significativa ($p > 0.05$). Su tamaño no corresponde al de los gránulos intercromatinianos descritos para plantas por Medina y colaboradores en 1989 pero no alcanza el tamaño de los gránulos pericromatinianos, siendo intermedios al de ambos y mayor al de los ribosomas adosados a la cara externa de la membrana nuclear (Fig 14a-14d).

Los gránulos presentes en acúmulos en las regiones inter y pericromatiniana son el rasgo distintivo del núcleo celular interfásico de *L. schismatica* y *T. alata* por su abundancia inusitada y por su tamaño intermedio al de los gránulos inter y pericromatinianos.

Otras estructuras ribonucleoproteicas.

Los cuerpos espiralados son de común observación en los núcleos del tegumento de *L. schismatica* y en los núcleos del

Fig.12. Micrografía electrónica a mayores aumentos de los grupos de abundantes gránulos en los núcleos de células del tegumento de *Lacandonia schismatica* (a,b) y *Triuris alata* (c, d) contrastadas con la técnica convencional para microscopía electrónica de acetato de uranilo-citrato de plomo (a, c) y la técnica de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (b, d). Los gránulos son EDTA positivos lo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica. Cromatina (c). Gránulos en el espacio intercromatiniano (flechas). Aumento en (a, b) X 48,000. Aumento en c y d 47,000.

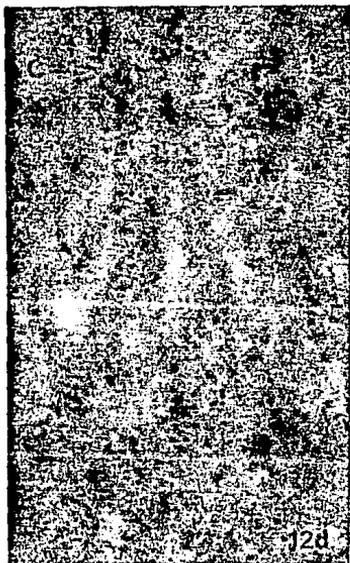
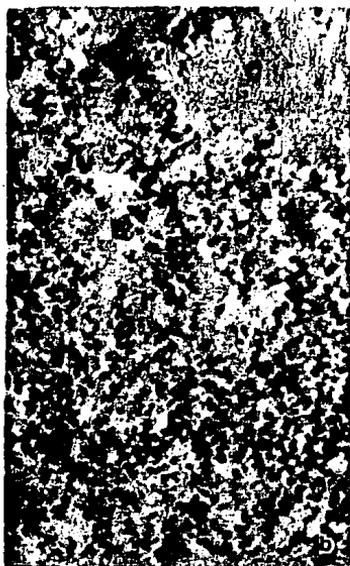


Fig.13. Micrografía electrónica a grandes aumentos de un núcleo del tegumento de *Lacandonia schismatica* contrastado con la técnica preferencial para RNP en la cual se observa que el tamaño de los gránulos de la region intercromatiniana (flechas gruesas) que forman acúmulos en el nucleoplasma es mucho mayor al de los ribosomas (r) en el citoplasma. Los poros nucleares delimitan el compartimiento nuclear y el compartimineto citoplasmático. Se observan las fibras que interconectan los gránulos presentes en el espacio intercromatiniano (flechas delgadas). Aumento X 116,600.

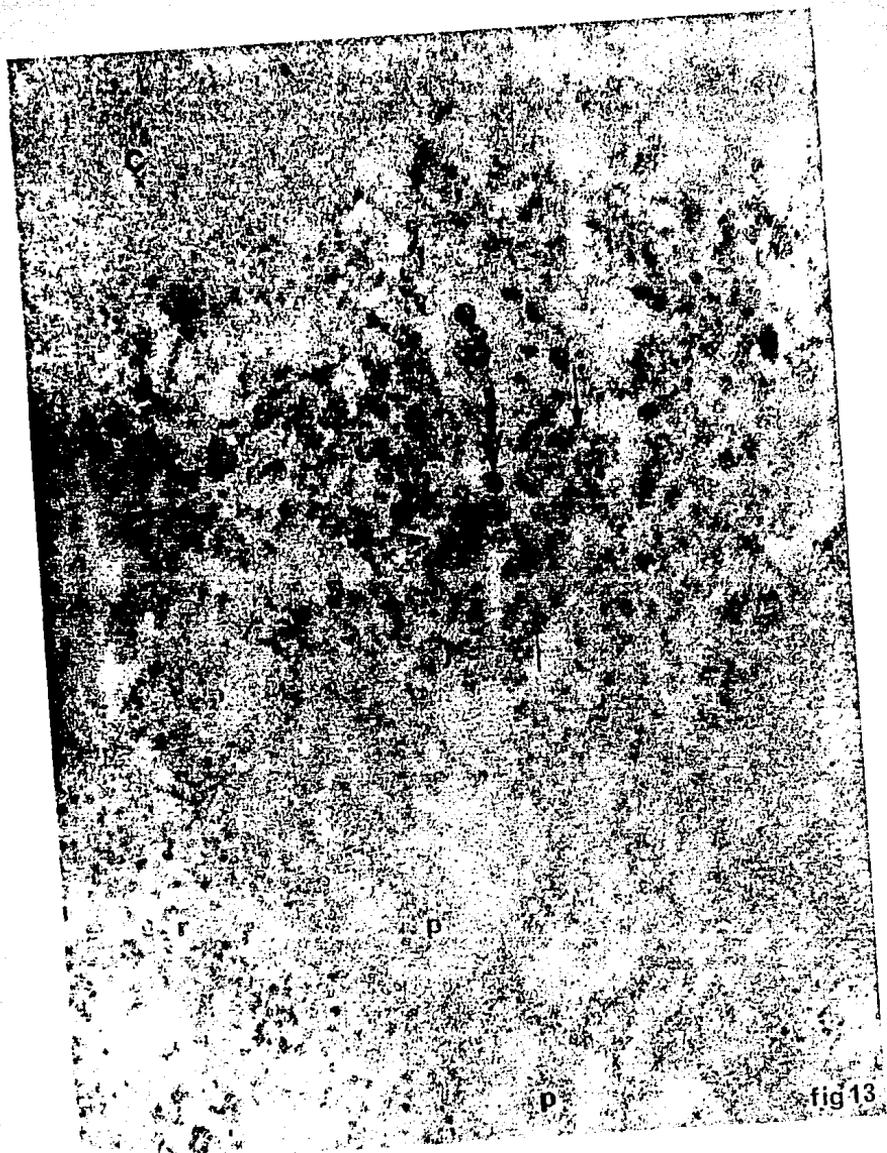
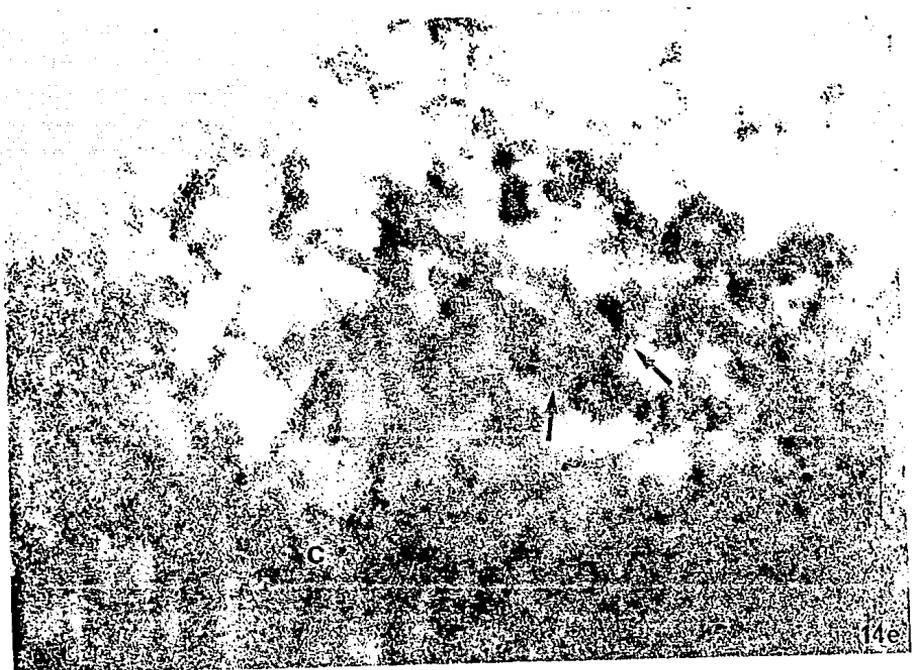
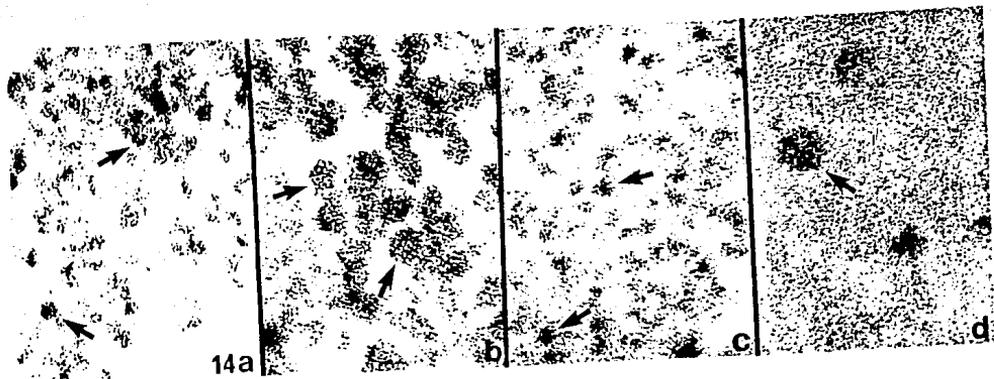


Fig.14. Serie de micrografías electrónicas (a-d) que ilustran que el tamaño de los gránulos que forman abundantes grupos en los núcleos de *Lacandonia schismatica*, es mayor al de los ribosomas e intermedio al de los gránulos intercromatinianos y los gránulos pericromatinianos. Ribosomas de *Lacandonia schismatica* (a) y gránulos que forman acúmulos en el espacio inter y pericromatiniano de ésta misma especie (b), contrastados con la técnica de EDTA. Gránulos intercromatinianos, (c) y pericromatinianos (d) de núcleos de hígado de rata contrastados con la técnica de bismuto. Aumento X 172,500.

Fig. 14e. Fibras pericromatinianas (flechas) en el núcleo de una célula del tegumento de *Lacandonia schismatica* en el borde de la cromatina compacta entremezcladas con gránulos formando un arreglo fibrogranular. Cromatina (c). Tinción con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. Aumento X 115,000.



receptáculo de *T. alata*. Se localizan entre grumos de cromatina compacta y presentan delgadas fibrillas que se prolongan de los mismos hacia el espacio intercromatiniano (Fig 15a y 15b).

Se encontraron también estructuras anulares con un diámetro de 0.5µm. Con la técnica convencional de acetato de uranilo-citrato de plomo muestran un anillo externo muy denso a los electrones rodeando a una zona de menor densidad. Al aplicar la técnica preferencial para ribonucleoproteínas, esta última zona obtiene un alto contraste blanqueándose el anillo externo lo que sugiere que las estructuras anulares tienen un componente central ribonucleoproteico rodeado por un anillo carente de ARN. Las estructuras anulares pueden encontrarse en asociación con el nucleolo o bien en la llamada región intercromatiniana (Fig 15c y 15d).

Las micrografías electrónicas de los núcleos de células somáticas del tegumento de *L. schismatica* y de células somáticas del receptáculo de *T. alata* presentan estructuras tipo complejo sinaptonémico entre grumos de cromatina compacta. El ancho del espacio claro en las regiones donde hay paralelismo entre grumos de cromatina compacta es de 380 A en *L. schismatica* y de 540 A en *T. alata*. A diferencia de los complejos sinaptonémicos típicos de células meióticas no presentan los componentes centrales (Fig 15e).

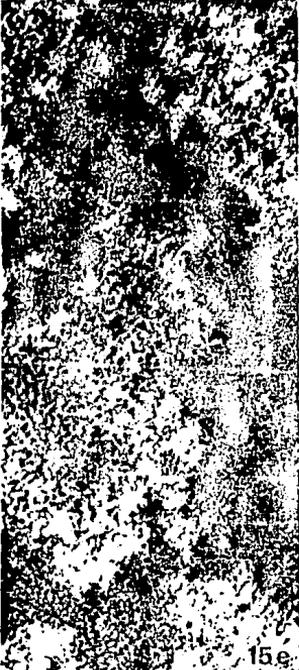
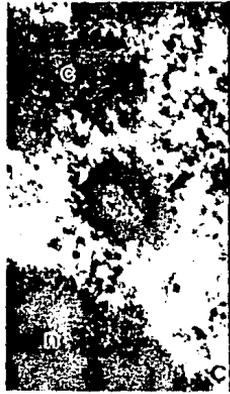
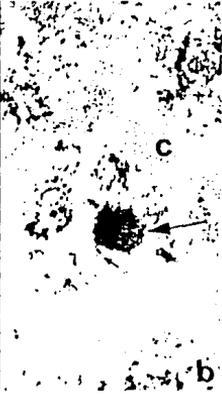
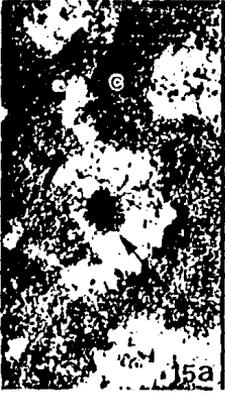
Fig.15.a y 15.b. Cuerpos espiralados de núcleos del tegumento de *Lacandonia schismatica* (flechas gruesas). Tienen forma esferoidal, se localizan entre grupos de cromatina compacta. Tinción con la técnica convencional (a), y con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (b). Del borde de los mismos se proyectan delgadas fibrillas hacia el espacio intercromatiniano (flechas delgadas). Aumento en (a) X 22,000. Aumento en (b) X 29,500.

Fig.15.c y 15.d. Micrografías electrónicas de estructuras anulares (flechas) de núcleos del tegumento de *Lacandonia schismatica* teñidas con acetato de uranilo- citrato de plomo (c) y la técnica preferencial para RNP (d). Con la técnica convencional se observa un componente central poco denso a los electrones y un anillo externo fuertemente contrastado. El componente central es EDTA positivo lo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica, pero el anillo externo se blanquea. Las estructuras anulares pueden estar en asociación con el nucleolo (c) o entre grupos de cromatina compacta. Aumento en (c) X 50,000. Aumento en (d), X 46,000.

Fig.15.e. Estructura tipo complejo sinaptonémico (flechas) de un núcleo de células del tegumento de *Lacandonia schismatica* postfijada con tetraóxido de osmio. Se encuentra entre grumos de cromatina compacta. Tinción con la técnica convencional para microscopía electrónica. Aumento X 40,000.

Fig.15.f. Micropuff (mp), en el núcleo de una célula del receptáculo de *Triuris alata* teñido con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se observan zonas de mayor y menor densidad electrónica. Nucleolo (n); cromatina (c). Aumento X 80,000.

Fig.15.g. Cuerpo nucleolar (flecha) compacto de un núcleo de una célula del tegumento de *Lacandonia schismatica*, teñido con la técnica preferencial para RNP. Nucleolo (n); cromatina (c). Aumento X 41,600.



Otras estructuras comúnmente observadas en *L. schismatica* y *7. alata* son los llamados micropuffs. Estos se encuentran unidos al retículo de cromatina y presentan una densidad de tinción heterogénea (Fig 15f).

En las micrografías electrónicas es común la observación en ambas especies de cuerpos nucleolares o cariosomas que aparecen como estructuras compactas adyacentes al nucleolo, su densidad de tinción es muy semejante a la del nucleolo y predomina en ellos un componente granular. Los cuerpos nucleolares aparecen bien contrastados con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (Fig 15g).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla No. 1

Tabla 1. Semejanzas en la ultraestructura nuclear de *L. schismatica* y *T. alata*:

Tipo de núcleo de acuerdo al arreglo de la cromatina.	Reticulado
Cromatina compacta	Formando un retículo en el nucleoplasma.
Nucleolo	Generalmente uno o dos. Esferoidales y compactos. El componente granular es el más abundante.

Partículas ribonucleoproteicas extranucleolares:

Fibras pericromatinianas	Presentes en la periferia de la cromatina compacta, entremezcladas con gránulos formando un arreglo fibrogranular.
Gránulos pericromatinianos	Son de rara observación en los núcleos de ambas especies.
Gránulos intercromatinianos	No se observaron gránulos intercromatinianos típicos
Gránulos en el espacio inter y pericromatiniano	Formando cúmulos. Su tamaño es intermedio al de los llamados gránulos inter y pericromatinianos. Están interconectados por finas fibras. Son muy abundantes en ambas especies y son el rasgo distintivo de <i>L. schismatica</i> y <i>T. alata</i>
	Cuerpos nucleolares compactos EDTA positivos. Cuerpos espiralados de cuyos bordes se proyectan finas fibras hacia el espacio intercromatiniano.
	Micropuffs, con una densidad de tinción heterogénea.
Otras estructuras:	Estructuras anulares con un componente central EDTA positivo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica y un anillo externo que se blanquea con esta técnica. Pueden estar en asociación con el nucleolo o en el espacio intercromatiniano.
	Estructuras tipo complejo sinaptonémico en núcleos de células somáticas.

VI. Discusión

El núcleo celular interfásico de *L. schismatica* y *T. alata* es muy semejante en su organización ultraestructural general al de otras monocotiledóneas por presentar una doble membrana nuclear interrumpida por poros, cromatina compacta formando un retículo en el nucleoplasma, un nucleolo con sus regiones características, micropuffs y cuerpos espiralados; sin embargo, discrepa de las estudiadas hasta ahora por presentar estructuras anulares, estructuras tipo complejo sinaptonémico en células somáticas, y por poseer en la región inter y pericromatiniana abundantes gránulos con un tamaño intermedio entre los llamados intercromatinianos descritos para las plantas por Medina y colaboradores en 1989 y los gránulos pericromatinianos.

La similitud en la estructura de los núcleos de estas especies sugiere que conforman un grupo natural dado el carácter utilizado. Sin embargo, no se puede afirmar lo anterior porque se desconoce si los gránulos son una característica privativa de ambas especies o si la comparten con grupos afines, es decir, con otros miembros de la subclase Alismatidae. Por lo anterior, se pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios ultraestructurales comparativos del núcleo celular interfásico de ambas especies con grupos afines del orden Alismatales e incluso con el orden Najadales e Hydrocharitales de la subclase Alismatidae.

Los resultados que de estos estudios y otros similares se deriven podrían ayudar a trabajos taxonómicos y filogenéticos más finos.

Los gránulos presentes en las regiones inter y pericromatiniana de *L. schismatica* y *T. alata* son de la misma naturaleza ya que: son EDTA positivos, lo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica; su tamaño es intermedio entre los gránulos intercromatinianos de las plantas (20 a 25 nm) y los llamados gránulos pericromatinianos (30 a 50 nm) y en ambas especies son muy abundantes.

Dado que el rasgo característico y distintivo del núcleo celular interfásico de *L. schismatica* y *T. alata* con respecto al resto de las monocotiledóneas hasta ahora estudiadas, lo constituyen los gránulos localizados indistintamente en el ambiente peri e intercromatiniano del nucleoplasma, es de suma importancia caracterizarlos por medio de citoquímica ultraestructural y microscopía electrónica mediante la aplicación de la técnica de impregnación con bismuto, para determinar si son homólogos a los gránulos intercromatinianos; emplear la técnica de autorradiografía ultraestructural para conocer el sitio de síntesis del ARN y su mecanismo de transporte y determinar si tienen uno alterno de almacén, llevar a cabo digestiones enzimáticas con RNasa, DNasa y proteasas para confirmar su

naturaleza, realizar estudios de inmunolocalización con antiDNA y anti snRNPs para conocer su naturaleza química y su asociación con los genes, así como aislarlos bioquímicamente y compararlos con otras RNPs.

Los estudios citoquímicos ultraestructurales que se proponen anteriormente, ayudarán a establecer si los gránulos están asociados a los mecanismos que dieron origen macroevolutivamente a una familia constituida hasta ahora, por un género y especie: *L. schismatica*.

El conjunto de los resultados, que de estos estudios se deriven, arrojarán luz sobre la naturaleza química de los gránulos y por lo tanto sobre las posibles modificaciones del núcleo celular en un proceso macroevolutivo.

VII. Conclusiones

- 1) El rasgo distintivo de los núcleos celulares de *L. schismatica* y *T. alata* lo constituyen los gránulos presentes en el espacio intercromatiniano. Sin embargo, las demás regiones del núcleo celular interfásico de ambas especies son muy similares al de otras monocotiledóneas.
- 2) Los gránulos observados en el espacio intercromatiniano de *L. schismatica* y *T. alata* no corresponden por su abundancia y tamaño a los llamados gránulos intercromatinianos descritos en plantas por Medina N.A. y colaboradores en 1989. El tamaño de los gránulos es intermedio al de los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos.
- 3) Los gránulos de *L. schismatica* y *T. alata* parecen ser RNPs de la misma naturaleza ya que: son EDTA positivos, su tamaño es intermedio entre el de los gránulos intercromatinianos (20-25nm) y los gránulos pericromatinianos (30-50nm), y son muy abundantes.
- 4) Se pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios ultraestructurales comparativos del núcleo celular interfásico de *L. schismatica* y *T. alata* con grupos afines para determinar si los gránulos son una característica privativa de estas especies o si la comparten con otras.

VIII. Referencias

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing Inc., New York & London.

Aguilar M.X. 1990. Variaciones de los gránulos pericromatinianos durante la miogénesis. Tesina Especialidad en Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas, Fac. de Ciencias, U.N.A.M. México.

Ayensu, E.S. 1981. Selvas. Ediciones Folio, España pp 199.

Berezney, R., 1979. Dynamic properties of the nuclear matrix. En: Busch, H. (ed.), The Cell nucleus. Academic Press, New York pp. 413-456

Bernhard, W., 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27: 250-265

Church, K., Moens, P.B. 1976: Centromere behavior during interphase and meiotic prophase in *Allium fistulosum* from 3-D EM reconstruction. Chromosoma 56:249-263.

Cronquist, A. 1981. An integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press, New York p.p. 1031-1076.

Davidse, G. & E. Martínez. 1990. The chromosome Number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Systematic Botany 15(4):635-637.

De Candolle, A. P., 1813:Théorie Elementaire de la Botanique on Exposition des principes de la classification Naturelle.

De Robertis y De Robertis H. 1983. Biología Celular y Molecular. El Ateneo, Argentina pp 613.

Fakan, S., Leser, G., Martin, T., 1984: Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections. J. Cell Biol., 98:358-363.

Franke, W. 1987. Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. Cell. 48:3-4.

García, G., 1939. Mapa de los tipos de vegetación de la reserva de Montes Azules. INREB.

Giesen, H., 1938: Triuridales.- Das Pflanzenreich IV 18: 1-88.

Gómez P., L.D., and Martínez S., E., 1992: *Triuris* Miers. En Flora Mesoamericana, Vol. 6, G. Davidse, M. Souza S., A.O. Chatters (Eds).

Gómez-Pompa, Vázquez-Yanes y Guevara S. 1972. "The tropical rain forest: a nonrenewable resource", Science 177, pp. 762-765.

Grant, V., 1985: The evolutionary process. Columbia Univ. Press, New York.

Hutchinson, J., 1959: The families of flowering plants, vol. I. 23. Clarendon Press, Oxford.

Jiménez-García, L.F. 1988. El nucleólo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral, Biología, Fac. de Ciencias, U.N.A.M. México.

Jiménez, L.F., Elizundia, J.M., López, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría, O.M., & Vázquez-Nin G.H. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists. BioSystems. 22:103-116.

Jones, S.B. 1988. Sistemática Vegetal. Mc. Graw-Hill de México, S.A. de C.V. p.p. 12-35; 87-114.

Jordan E.G., Timmis J.N. & Trewavas A.J. 1980. The plant nucleolus. In: The Biochemistry of plants. Academic Press, New York-London, Vol.1, pp 489-588.

Kryzowska-Gruca S., Zborek A. & Gruca S. 1983. Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation. Cell Tissue Res. 231:427-437.

Kryzowska-Gruca S., Kulczycka E. & Zboreka. 1985. Cytochemical study on the localization of interchromatin granules during the cell division. Act histochem. 55: 49-76.

Maas, P.J.M. & T.Rubsamen. 1986. Triuridaceae. Flora Neotrop. 40:1-55.

Márquez, J., Engleman, M., Martínez, A., Martínez E., & Ramos, C. 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 76:124-127.

Márquez, J., 1990. Anatomía Reproductiva en el orden Triuridales Simposio. XI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxtepec, Morelos.

Martínez, E. & Ramos C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): Una Nueva Familia de México Ann Missouri Bot. Gard. 76: 128-135.

Meave, J. 1990. Estructura y composición de la selva alta perennifolia de los alrededores de Bonampak. Instituto Nacional de Antropología e Historia. pp.11-25.

Medina, M., Moreno, S., Martin, M., & Fernandez-Gomez, M. 1989.
Interchromatin granules in plant nuclei. *Biology of The Cell*.
67:331-339

Miranda y Hernández X. 1963. Los tipos de vegetación de México y
su clasificación. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 28, pp. 29-178.

Monneron, A. & Bernhard W., 1969. Fine structural organization
of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J.*
Ultrastruct. Res. 27: 266-288

Moreno Diaz de la Espina, S., Risueño, M.C., Medina, F.J., 1982:
Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic
characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus.
Biol. Cell 44:229-238.

Puvion, E., Moyne, G, 1978. Intranuclear migration of newly
synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Experimental cell*
research 115:79-88.

Puvion-Dutilleul, F., Puvion, E. 1981. Relationships between
chromatin and perichromatin granules in Cadmium-treated isolated
hepatocytes *Journal of ultrastructure Research.* 74:341-350.

Puvion, E., Viron, A. 1981. In situ structural and functional
relationships between chromatin pattern and RNP structures

involved in non-nucleolar chromatin transcription. Journal of Ultrastructure Research. 74:351-360.

Risueño, M.C., Moreno Diaz de la Espina, S. Fernandez-Gomez, M.E., Giménez-Martín, G. 1978: Nuclear micropuffs in *Allium cepa* cells. I. Quantitative, ultrastructural and cytochemical study. Cytobiologie 16:209-223.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa, México. pp 432

Scagel, R. 1987. El Reino Vegetal. Omega S.A. Barcelona pp 672-674

Schultz, M., 1989. Ultrastructural study of the coiled body and a new inclusion, the "Mykaryon," in the nucleus of the adult rat sertoli cell. The Anatomical Record. 225:21-25.

Spector, D.L., Schrier, W. H. and Busch, H. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. Biol. Cell. 49:1-10

Swift, H., 1959. Studies on nuclear fine structure. Brookhaven Symp. Biol. 12:134-152.

Takhtajan, A., 1969: Flowering plants. Origin and dispersal. Smithsonian Inst. Press, Washington, D.C.

Takhtajan, A., 1986. Floristic Regions of the World University of California Press.

Vázquez-Nin, G.H. and Bernhard, W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and balbiani ring granules. J. Ultrastruct. Res. 36: 842-860.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverria, O.M., Fakan, S., Leser, G., and Martin, T.E. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. Chromosoma. 99:44-51.

Watson, M.L. 1962. Observations a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat mouse. J. Cell Biol. 14: 162-167.

Wassef, M., 1978. A cytochemical study of interchromatin granules. J. Ultrastruct. Res. 69:121-133.