

00341



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado



Estudio citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural de los
"gránulos de *Lacandonia*", partículas presentes en los núcleos
de *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C. H.
Ramos (Lacandoniaceae: Triuridales)

T R A B A J O
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
Especialista en Microscopia Electrónica
Aplicada a las Ciencias Biológicas
P R E S E N T A
LOURDES TERESA AGREDANO MORENO

Director del Trabajo: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
1. <i>Lacandonia schismatica</i> E. Martínez & C.H. Ramos.....	3
2. El Núcleo celular interfásico de plantas.....	9
3. El Núcleo celular interfásico de <i>Lacandonia schismatica</i>	24
3.1 Los "gránulos de <i>Lacandonia</i> ".....	25
III. Objetivo	28
IV. Metodología.....	29
1. Oxinitrato de bismuto.....	30
2. Inmunolocalización ultraestructural.....	33
V. Resultados.....	39
VI. Discusión.....	50
VII. Conclusiones.....	54
VIII. Referencias.....	55

I. RESUMEN

Los "gránulos de *Lacandonia*" ("*Lacandonia granules*") son estructuras microscópicas presentes en los núcleos celulares de *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*. Presentan características de distribución y tamaño intermedias entre los gránulos intercromatinianos (GICs) y los gránulos pericromatinianos (GPCs). Con el propósito de determinar si estas partículas son equivalentes a los GICs presentes universalmente en los núcleos de animales, plantas y hongos, se utilizaron dos marcadores: 1) La técnica de oxinitrato de bismuto preferencial para GICs y 2) la técnica de inmunolocalización ultraestructural con un anticuerpo monoclonal de ratón (Y12). Este anticuerpo reconoce un epitopo común a las partículas ribonucleoproteicas que contienen los RNAs U1, U2, U4, U5 y U6 (anti-Sm) y que marca los GICs de animales y plantas, así como las fibras pericromatinianas en los sitios de transcripción.

Se procesaron botones florales y flores en diferentes etapas de desarrollo. Para la técnica de oxinitrato de bismuto el tejido se fijó en glutaraldehído al 6% en buffer de cacodilatos 0.05M a pH 7.4. La tinción con bismuto se aplicó en fragmentos de tejido (pre-inclusión) o en cortes ultrafinos (post-inclusión). Para la técnica de inmunolocalización, las muestras se fijaron con una mezcla de glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.16M a pH 7.2. Como primer anticuerpo, se utilizó un anticuerpo anti-Sm monoclonal de ratón (Y12) y como anticuerpo secundario una inmunoglobulina de ratón unida a partículas de oro de 10 ó 15 nm de diámetro.

Con la técnica de oxinitrato de bismuto se contrasta una fracción de las fibras pericromatinianas. También se contrastan ocasionalmente pequeños gránulos con un diámetro menor al de los "gránulos de *Lacandonia*", así como la periferia de estos últimos. Sin embargo, los "gránulos de *Lacandonia*" son negativos a este procedimiento. Los resultados del inmunomarcaje con el anticuerpo Y-12 indican la presencia de snRNPs en las fibras pericromatinianas y en menor proporción en la periferia de los "gránulos de *Lacandonia*".

El conjunto de estas observaciones indica que los "gránulos de *Lacandonia*" no son morfológica, citoquímica e inmunocitoquímicamente equivalentes a los GICs. Alternativamente, los "gránulos de *Lacandonia*" podrían ser similares a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de Balbiani, estructuras nucleares que se piensa están relacionadas con el almacén y/o transporte de mRNAs específicos. Con base en lo anterior, se sugiere aislar y determinar el contenido de los "gránulos de *Lacandonia*" mediante técnicas bioquímicas y moleculares para determinar su

papel citofisiológico en el metabolismo nuclear de *L. schismatica*.

II. INTRODUCCION

1. *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C.H. Ramos

La enorme diversidad de las angiospermas comprende plantas de dimensiones muy diferentes, desde las minúsculas lentejas de agua de menos de un centímetro de longitud hasta los árboles de eucalipto de más de quince metros de altura y un rango casi infinito de flores que abarcan desde las magnolias hasta las orquídeas. Toda esta variedad debió surgir hace aproximadamente cien millones de años, en un periodo relativamente corto y reciente del tiempo geológico (Dilcher 1984).

Las flores distinguen a las angiospermas de todas las otras plantas con semilla ó gimnospermas. En las angiospermas los verticilos sexuales femeninos consisten de carpelos los cuales contienen los óvulos. Los verticilos sexuales masculinos son los estambres y producen los granos de polen. En las flores bisexuales los estambres están generalmente colocados debajo y alrededor de los carpelos (De Candolle 1813; Hutchinson 1959; Takhtajan 1969; Cronquist 1981; Dilcher 1984). Tanto los verticilos sexuales femeninos como masculinos están rodeados por pétalos en el interior y sépalos en el exterior, variadamente modificados para proteger a la flor ó para ayudar en la polinización. Esta organización floral básica es típica

de las flores bisexuales que se encuentran en el registro fósil, así como de todas las angiospermas que se conocen en la actualidad, con la excepción de *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C.H. Ramos (Lacandoniaceae: Triuridales). (Fig. 1).

L. schismatica es una planta pequeña saprofita de hasta nueve centímetros de alto. Su característica morfológica más interesante es la inversión espacial de los verticilos sexuales, con el androceo ocupando la parte central de la flor rodeado por el gineceo. Vive sobre substratos de materia orgánica muy húmedos. 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. Forma parte del sotobosque de la Selva Lacandona. La localidad tipo se sitúa en el borde de la zona núcleo de la reserva Integral de la Biósfera Montes Azules en el municipio de Ocosingo, Crucero Corozal, 170 kilómetros al sureste de Palenque, camino a Boca Lacantum, sobre la carretera fronteriza del sur, Chiapas, México (Martínez & Ramos, 1989). Hasta el momento, no ha sido posible cultivarla no obstante haberse intentado por medio de cultivo de tejidos (en el Jardín Botánico, UNAM) y a través del traslado de individuos de esta especie, con su propio substrato, a cámaras controladas en la Facultad de Ciencias, en donde se trataron de igualar las condiciones de temperatura y humedad de su hábitat.

FIG. 1A.-*Lacandonia schismatica*. EN LA FLOR SE OBSERVA LA POSICION CENTRAL DEL ANDROCEO (1) CON RESPECTO AL GINECEO (2). TEPALOS (3); BRACTEA (4); RAICES (5); RIZOMA (6).

FIG. 1B.-CORTE LONGITUDINAL DE DOS CARPELOS (C). TEPALO (TP); SACO EMBRIONARIO (S); TEGUMENTOS (TG).

FIG. 1C.-NUCLEO INTERFASICO DE UNA CELULA DEL TEGUMENTO DEL OVULO. NUCLEOLO (N); COMPONENTE GRANULAR DEL NUCLEOLO (G); COMPONENTE FIBRILAR DENSO (CFD), CENTRO FIBRILAR (CF); CROMATINA (C); CUERPOS FIBRILARES (f); FIBRAS PERICROMATINIANAS (f); MICROPUFFS (m); CUERPOS ESPIRALADOS (e); ESTRUCTURA ANULAR (EA); ESTRUCTURA TIPO COMPLEJO SINAPTONEMICO (CS); "Gránulos de *Lacandonia* (GL)".

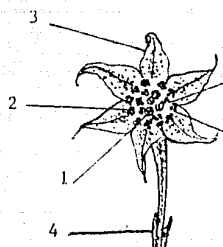


Fig 1.a.

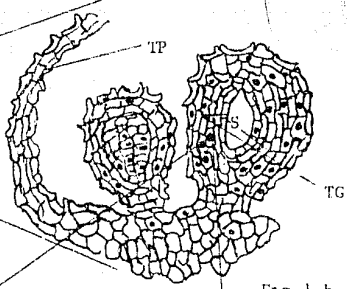


Fig 1.b.

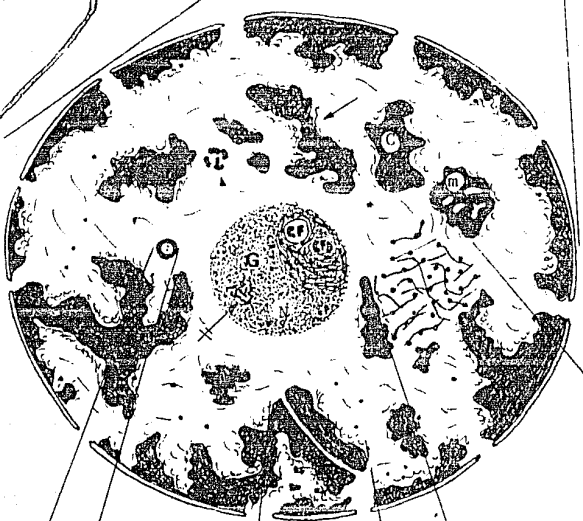
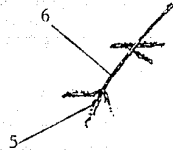
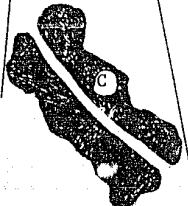


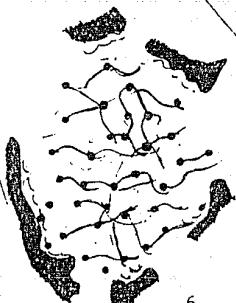
Fig 1.c.



(EA)



(CS)



(GL)

De acuerdo con Cronquist (1981) su ubicación taxonómica es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia: Lacandoniaceae

Género: *Lacandonia*

Especie: *L. schismatica*

La inversión espacial de los verticilos sexuales, aunada al hecho de que los individuos de esta especie conforman una población muy pequeña, localizada dentro de un área muy restringida de la selva Lacandona en Chiapas, México, parece indicar que *L. schismatica* posiblemente se originó por un proceso macroevolutivo, de acuerdo con modelos propuestos para otros organismos (Grant 1985).

Debido al interés despertado por esta planta, actualmente se llevan a cabo estudios que abarcan su anatomía reproductiva y vegetativa y su embriología (Márquez-Guzmán et al. 1989; Márquez-Guzmán 1990; Quiroz Choperena 1990); estudios genéticos (Davidse y Martínez 1990); estudios bioquímicos (G. Delgado, no publicado), de cultivo de tejidos y estudios ultraestructurales del núcleo celular interfásico de esta especie (Jiménez-García et al. 1990 (a); Jiménez-García et al.

1990 (b); Jiménez-García et al. 1991; Agredano 1991; Vázquez-Nin et al. 1992), y sobre su micorriza (Palacios y Pérez 1993, en prensa).

Gracias a los diversos estudios realizados, actualmente se ha acumulado información acerca de su biología. Por ejemplo, se sabe que el tapetum de la Familia Lacandoniaceae es de tipo secretor, y que la composición de metabolitos secundarios en *L. schismatica* es de glicéridos y sacáridos (G. Delgado com. pers.). Los estudios de Davidse & Martínez en 1990, revelaron que el número cromosómico de esta especie es de nueve. Además, los estudios sobre su anatomía reproductiva han permitido describir un nuevo tipo de fecundación para esta familia en la cual, antes de la antesis, los granos de polen germinan dentro de la antera indehiscente, los tubos polínicos crecen entre las células del receptáculo y después se dirigen hacia los óvulos, de tal modo, que uno de ellos entra al saco embrionario por el micrópilo a través de una de las sinérgidas, presentándose la doble fecundación. Una vez efectuada la doble fecundación, la flor se encuentra abierta (Vázquez, 1992).

2. El Núcleo Celular Interfásico de plantas

En la actualidad son muchos los estudios que se tienen sobre la organización del núcleo celular en interfase, los cuales han sido posibles gracias al uso de diferentes técnicas entre las que se encuentran las de citoquímica e inmunocitoquímica ultraestructural, así como las técnicas bioquímicas. Sin embargo, la mayoría de estos estudios emplean tejidos animales para conocer la naturaleza y organización de las diferentes regiones nucleares. En plantas, los estudios sobre la organización nuclear son escasos y se enfocan principalmente a la organización nuclear de plantas que presentan un arreglo de cromatina reticulado (Lafontaine 1974; Luck & Lafontaine 1983), el cual solo se presenta en plantas. Además, se ha dado mayor énfasis al estudio de la cromatina compacta y al cuerpo nucleolar (Motte et al. 1991; Luck & Lafontaine 1980; Jordan et al. 1980; Luck & Lafontaine 1982). Por otro lado, muy pocos son los estudios que se tienen sobre los núcleos celulares en interfase que presentan un arreglo de la cromatina de tipo cromocéntrico (Moreno Díaz de la Espina et al. 1992).

El núcleo 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 ribonucleoproteicos (en Aguilar 1990).

a) COMPONENTES FOSFOLIPIDICOS

- ENVOLTURA NUCLEAR

Consiste de dos membranas, de 5 a 7 nm de grosor, entre las cuales se encuentra el espacio perinucleolar ó cisterna de 20 nm aproximadamente. Posee ribosomas adheridos a la parte citoplasmática de su membrana externa y es continua con el retículo endoplásmico. Constituye una barrera entre los procesos de transcripción y traducción, lo que ha permitido el desarrollo de una serie de procesos reguladores relacionados con la expresión génica (en Alberts et al. 1989).

b) COMPONENTES PROTEICOS

- COMPLEJO DE PORO

Las envolturas nucleares de todos los eucariontes están atravesadas por poros nucleares, cada uno de los cuales está rodeado por una estructura discoidal conocida como complejo de poro nuclear. El complejo está compuesto de un lumen de forma circular de 70 nm de diámetro revestido por tres anillos. Cada uno de estos anillos está compuesto de ocho subunidades embebidas en una matriz. La parte central del poro es el canal para el transporte de productos nucleares de varios tipos. La localización y estructura de los complejos de poro, sugiere 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 (en Alberts et al. 1989).

- LAMINA DENSA

Se encuentra adosada a la cara interna de la envoltura nuclear. Está compuesta por una red fibrosa que 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. Su composición, similar a la de los filamentos intermedios, sugiere que tiene relación con el citoesqueleto.

- MATRIZ NUCLEAR

Consiste de un complejo de poro-lámina residual externo, residuos del nucléolo y una malla interna que interconecta estos dos elementos. Se ha observado que la malla interna, además de las estructuras fibrilares, comprende a los gránulos intercromatinianos (Berezney 1979; Krzyzowska-Gruca et al. 1983). Esta estructura se puede obtener después de tratar los núcleos aislados con detergentes, nucleasas y concentraciones altas de sales. c) DESOXIRRIBONUCLEOPROTEINAS

- CROMATINA

La cromatina está compuesta de fibras 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).

El ADN en las células eucariontas está asociado con grandes cantidades de proteínas, las cuales se dividen en histonas y proteínas nucleares ácidas. Las histonas se pueden clasificar en cinco grupos con base en 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 encuentran en la cromatina de las plantas (Jordan et al. 1980). Se considera que las últimas cuatro histonas mencionadas se encuentran entre las proteínas más conservadas durante la evolución.

La cromatina condensada en los núcleos de algunas plantas, está organizada en cromocentros asociados con la envoltura nuclear y con el nucléolo presentando regiones ocasionales de cromatina en el nucleoplasma, entremezcladas con regiones de cromatina laxa, fibras y gránulos. Estos núcleos se denominan cromocéntricos y son característicos de las células animales y

de algunas plantas e.g. *Lycopersicon esculentum*. En los núcleos interfásicos de otras plantas se observan bandas de cromatina compacta formando un retículo en el nucleoplasma. El retículo de cromatina en interfase es poco más o menos conspicuo dependiendo de las especies. Las diferencias se deben al diámetro de las bandas de cromatina, así como a la presencia de cromocentros (en Jordan et al. 1980), el tamaño y número de los cuales difiere de una planta a otra. Como resultado de estas diferencias, algunas especies presentan núcleos que son intermedios en estructura entre el tipo reticulado y el cromocéntrico (Lafontaine 1974). En el núcleo interfásico se observan varios grados de condensación de la áreas de cromatina laxa pueden estar asociadas con altas tasas de síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y contienen partículas ribonucleoproteicas. Las áreas de cromatina densa son inactivas en la síntesis de ARN.

El patrón reticulado puede observarse en muchas plantas e.g. *Allium cepa*. Las plantas con un núcleo reticulado tienen cromosomas más grandes, así como más ADN por cromosoma y más ADN por célula (Jordan et al. 1980). Algunos cromocentros están incorporados comunmente en estas bandas (Lafontaine 1974). El patrón reticulado de la cromatina existe únicamente en las plantas (Jiménez-García et al. 1989).

d) RIBONUCLEOPROTEINAS

- El NUCLEOLO

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

Los centros fibrilares son regiones semidensas a los electrones, cuando se observan con las técnicas habituales para microscopía electrónica, contienen fibras de, aproximadamente, 5 nm 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 15 a 20 nm de diámetro y representa el sitio de procesamiento más tardío, maduración y almacenamiento de prerribosomas. En algunos nucleolos puede existir una región fibrogranular o nucleolonema en las que se

mezclan las fibras de 4 a 8 nm de espesor y 20 a 40 nm de longitud con los gránulos de 15 a 20 nm de diámetro. En las células animales se encuentra una cubierta de cromatina perinucleolar rodeando al nucleolo la cual no se considera un constituyente nucleolar. Ocasionalmente penetran en el nucleolo fibras delgadas que parten de la cromatina perinucleolar y que, probablemente, tengan conexión con los centros fibrilares (en Jiménez-García 1988). La cromatina perinucleolar en las plantas, está restringida a una conexión clara del nucleolo con una o dos bandas de cromatina densa (Jordan et al. 1980) y es parte de los NORs interfásicos (Motte et al. 1991).

Las especies de plantas con un núcleo interfásico cromocéntrico presentan un solo nucleolo conspicuo. Por el contrario, las plantas con un núcleo reticulado presentan, frecuentemente, más de un nucleolo en la interfase (Lafontaine 1974).

- CUERPOS FIBRILARES

Otras estructuras presentes en los núcleos de las plantas son los cuerpos fibrilares. Estas son estructuras compactas rodeadas por un halo claro, formadas por fibras de 7.5 a 10 nm las cuales a su vez, están formadas de fibras más delgadas de 1.5 a 2 nm. Su forma elipsoidal y su densidad electrónica es menor que la del nucleoplasma. Se encuentran preferencialmente

en el núcleo, aunque también pueden encontrarse en el citoplasma, donde presentan una estructura fibrilar más laxa. Pueden estar asociados al componente granular del nucleolo, a la heterocromatina en el espacio intercromatiniano o bien a la envoltura nuclear. Son negativos a la tinción con EDTA. Estudios citoquímicos señalan que estos cuerpos están compuestos principalmente de proteínas y que contienen pequeñas cantidades de ADN (Moreno Díaz de la Espina & Risueño 1977).

Los cuerpos fibrilares son muy escasos en los núcleos de células animales y vegetales. Sin embargo, su número puede aumentar cuando se bloquea la síntesis de ARN nucleolar o extranucleolar y la síntesis de proteínas. Los cuerpos fibrilares parecen corresponder a la expresión morfológica de un bloqueo de la transcripción constituyendo, posiblemente, un

sistema de eliminación para proteínas y ADN del núcleo (Moreno Díaz de la Espina & Risueño 1977).

- CUERPOS ASOCIADOS AL NUCLEOLO

También llamados karyosomas, cuerpos laxos (Jordan 1976) o esférulas (Lucke y Lafontaine 1982). Son estructuras típicas de los núcleos cromocéntricos y reticulados de las plantas. Estas estructuras nucleares se observan estrechamente asociadas con la superficie nucleolar, adyacentes al nucleolo

o libres en el nucleoplasma (Jordan et al. 1980). Son cuerpos esféricos de 0.5-1.5 μm de diámetro. Investigaciones ultraestructurales recientes revelan que estos cuerpos nucleares presentan una estructura fibrilar y que poseen las siguientes propiedades citoquímicas: obtienen un fuerte contraste con la técnica de EDTA (Bernhard 1969), reaccionan a la tinción con oxinitrato de bismuto y a la tinción de plata; de la misma forma que el componente fibrilar denso del nucleolo (Luck y Lafontaine 1982; Moreno Díaz de la Espina et al. 1992). Los cuerpos nucleares difieren, tanto en ultraestructura como en composición, de los centros fibrilares y de la cromatina asociada a el nucleolo. No muestran continuidad física con estas estructuras. Los resultados de los estudios citoquímicos en *Ciser arietinum* indican que los cuerpos nucleolares esféricos contienen proteínas básicas y ácidas (Luck & Lafontaine 1982). Son sensibles a la digestión con RNasa, lo que indica que estos cuerpos contienen ARN. Además, son sensibles a la digestión con proteinasa K, lo que indica que están presentes cantidades considerables de proteínas en estas formaciones nucleares (Luck & Lafontaine 1982). La similitud de las reacciones citoquímicas de los cuerpos nucleolares y otros componentes nucleolares, así como su asociación al componente granular, sugiere que contienen productos nucleolares que son eventualmente exportados al nucleoplasma (Moreno Díaz de la Espina et al. 1982; Moreno Díaz de la Espina et al. 1992); sin embargo, el significado

funcional de estas estructuras permanece obscuro.

- MICROPUFFS O CENTROMEROS

Los micropuffs están formados de una red fibrilar de ribonucleoproteínas inmersas en una matriz proteica con características similares a las de los componentes nucleolares (Moreno Díaz de la Espina & Risueño 1977). El examen de cortes seriados del núcleo en microesporocitos de *Allium fistulosum*, ha revelado que los micropuffs corresponden a centrómeros (Church & Moens 1976; Moens & Church 1977). Investigaciones similares llevadas a cabo en células meristemáticas de *Allium porrum*, también llevaron a la misma conclusión (Lafontaine y Luck 1980). Los centrómeros pueden estar cercanos al nucleolo o en el espacio intercromatiniano en contacto estrecho con segmentos de cromatina compacta. Su densidad de tinción es heterogénea, con regiones densas y claras al haz electrónico (Jordan et al. 1980).

- CUERPOS ESPIRALADOS

Son componentes nucleares normales de las células animales y vegetales. Fueron observados por primera vez por Ramón y Cajal, quien los denominó cuerpos accesorios del nucleolo (Cajal 1903) Posteriormente, fueron observados al microscopio electrónico en los núcleos de células de hígado de rata por Monneron y Bernhard en 1969, quienes les dieron el nombre

actual. Moreno Díaz de la Espina et al. en 1982, los describieron más tarde en núcleos de células meristemáticas de *Allium cepa* y en células nucleares de *Pisum sativum*. Son estructuras compuestas de fibras densamente enrolladas las cuales tienen un diámetro de 15 a 25 nm que forman un cuerpo compacto esférico o poliedrico. Pueden estar cerca del nucleolo o de la envoltura nuclear pero, en la mayoría de los casos se encuentran en la región intercromatiniana formando conexiones con las estructuras ribonucleoproteicas o con la heterocromatina compacta. Las fibras que forman los cuerpos espiralados son EDTA positivas y son digeridos parcialmente por la RNasa y la tripsina (Monneron y Bernhard 1969). Resisten la digestión con DNasa y no se contrastan con la amina de osmio, lo que sugiere ausencia de ADN. La carencia de marcaje después de pulsos cortos de incorporación con uridinia tritiada, descarta la posibilidad de que los cuerpos espiralados sean sitios de transcripción (Moreno Díaz de la Espina et al 1982). No obstante, su continuidad con las fibras pericromatinianas parece indicar que se trata de estructuras nucleares estables posiblemente involucradas en el metabolismo del ARN. Recientemente, se ha observado que los cuerpos espiralados son más comunes en células transformadas (Spector et al 1992) y contienen elementos moleculares relacionados con el metabolismo tanto del pre-mRNA como del pre-rRNA (Brasch & Ochs 1992), como son snRNPs, fibrilarina y U3snRNA (Jiménez-García et al. com. pers).

- FIBRAS PERICROMATINIANAS

Monneron y Bernhard en 1969 describieron las fibras pericromatinianas como estructuras ribonucleoproteicas presentes en los bordes de cromatina compacta. En 1989 Jiménez-García y colaboradores demuestran su presencia universal en animales, plantas y hongos. Estas estructuras se observan principalmente en la periferia de la heterocromatina, en la llamada región pericromatiniana, pero también pueden encontrarse en el espacio intercromatiniano, especialmente en las células particularmente activas en la síntesis de ARN. Monneron y Bernhard (1969) propusieron que las fibras pericromatinianas representan la expresión morfológica de la transcripción y que son las primeras estructuras que contienen el ARN extranucleolar recién sintetizado.

La importancia de la región pericromatiniana en la transcripción del ARN extranucleolar se ha puesto de manifiesto en muchos estudios que emplean la autorradiografía ultraestructural como herramienta de estudio (Vázquez-Nin y Bernhard 1971; Fakan et al. 1976). Diversos estudios autorradiográficos, bioquímicos e inmunocitoquímicos sugieren la migración de las fibras pericromatinianas hacia el espacio intercromatiniano (Fakan y Bernhard 1973), así como la posibilidad de que, parte del procesamiento del pre-mRNA, sea parcialmente llevado a cabo en forma de fibras (Vázquez-Nin et al. 1990). Las FPC contienen elementos proteicos

relacionados con la eliminación de intrones (splicing), como son las snRNPs (Fakan et al 1984) y el factor esencial de splicing SC35, que no forma snRNPs (Spector et al 1992).

- GRANULOS PERICROMATINIANOS

Los gránulos pericromatinianos (Watson 1962) fueron descritos en los núcleos de mamíferos como cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro en su mayor parte rodeados por un halo claro de 25 nm. Presentan una estructura interna de tipo fibrilar, con fibras de 1.2 a 1.5 nm irregularmente enrolladas y embebidas en una matriz difusa. Se localizan en la periferia de la heterocromatina compacta y rara vez aislados en el área intercromatiniana. Están estrechamente ligados a las fibras pericromatinianas, encontrándose conexiones fibrilares entre estos gránulos y las fibras pericromatinianas (Vázquez-Nin y Bernhard 1971). Los gránulos pericromatinianos forman un grupo morfológicamente bien definido cuya presencia es universal en animales, plantas y hongos. El tamaño de los gránulos pericromatinianos en plantas es variable. Se encuentran frecuentemente como pares en la mayoría de las plantas y en algunos casos como grupos lineares. Algunas plantas presentan gránulos dentro de grumos de cromatina compacta (Jiménez García et al. 1989).

Son fuertemente contrastados por la técnica regresiva para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969), mientras que son

negativos en tinciones específicas para ADN (Monneron y Bernhard 1969; Vázquez-Nin & Bernhard 1971; Puvion-Dutilleul & Puvion E 1981). Además, se ha demostrado que los gránulos pericromatinianos resisten la digestión con RNasa, pero la extracción secuencial con proteasa y RNasa decrece su contraste o los destruye completamente (Monneron & 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 & Bernhard 1971). Estudios recientes indican que estos gránulos contienen ARN mensajero maduro, que ya ha sufrido el proceso de pérdida de intrones (Vázquez-Nin et al. 1990).

- GRANULOS INTERCROMATINIANOS

Los gránulos intercromatinianos (Swift 1959), son estructuras morfológicamente bien definidas. Sin embargo, sus funciones en el metabolismo nuclear no están bien definidas. Tienen un diámetro de 20 a 25 nm. En las células de mamíferos se encuentran formando cúmulos (Monneron y Bernhard 1969). Por el contrario, en las células de las plantas e invertebrados, son escasos y dispersos, llegando a encontrarse en pequeños grupos (Jiménez-García et al. 1989; Medina et al. 1989). Son componentes de la matriz nuclear (Berezney 1979; Kryzowska-

Gruca et al. 1983; Kryzowska-Gruca et al. 1985). Los estudios citoquímicos llevados a cabo en células animales y vegetales indican que los gránulos intercromatinianos son de naturaleza ribonucleoproteica (Monneron y Bernhard 1969), resisten la extracción secuencial con proteasa y RNasa y son resistentes a la digestión con RNasa y DNasa (Medina et al. 1989; Moreno Díaz de la Espina et al. 1992). Además, contienen grandes cantidades de proteínas fosforiladas (Wassef 1979).

Spector et al. (1983) y Fakan et al. (1984) encontraron, por inmunolocalización y análisis ultraestructural, que los gránulos intercromatinianos contienen snRNPs, las cuales son partículas relacionadas con la maduración del pre-mRNA. Por otro lado, los GIC también contienen el factor esencial de splicing SC35, el cual no forma snRNPs (Spector et al. 1992). Estos datos sugieren que los gránulos intercromatinianos están involucrados, estrechamente, con el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA. Específicamente, parecen ser sitios de almacén y/o ensamblado de factores de splicing.

3. El Núcleo celular interfásico de *L. schismatica*

Los estudios ultraestructurales del núcleo de esta especie, utilizando técnicas convencionales para microscopía electrónica, muestran que presenta un patrón reticulado característico de muchas monocotiledóneas (Jiménez García et al 1992) (Fig. 1).

-CROMATINA

La cromatina compacta en *L. schismatica* se dispone, como retículo o red en el nucleoplasma. De la periferia de esta se extienden filamentos de cromatina hacia el nucleoplasma. Además se detectan pequeñas cantidades de cromatina en el cuerpo nucleolar.

-RIBONUCLEOPROTEINAS

L. schismatica presenta generalmente dos nucleolos esféricos compactos en los que se localiza el componente fibrilar denso, la región fibrilar y la región granular, pudiendo encontrarse cuerpos fibrilares asociados al componente granular del nucleolo. En estrecha asociación con la superficie nucleolar, se encuentran los karyosomas. Los centrómeros, al igual que en otras plantas, se encuentran unidos a segmentos de cromatina

compacta en el área intercromatiniana o bien cercanos al nucleolo.

En *L. schismatica* es común la observación de cuerpos espiralados en la región intercromatiniana, entre segmentos de cromatina compacta, formando conexiones con los mismos. Además, se han encontrado estructuras anulares, de 0.5 μm , con un componente central de posible naturaleza ribonucleoproteica rodeado por un anillo denso al haz electrónico (cuando se aplican técnicas convencionales para microscopía electrónica) que posiblemente contenga ADN o proteínas. Estos anillos pueden encontrarse en el área intercromatiniana y más frecuentemente, en asociación con el nucleolo. En algunas ocasiones se observan en células somáticas del tegumento, estructuras tipo complejo sinaptonémico, de aproximadamente 40 nm de ancho en segmentos de cromatina compacta. El espacio claro de esta estructura tiene un componente fibroso que, a diferencia de los complejos sinaptonémicos típicos, carece del componente lateral y central característicos de los mismos.

3.1 Los "gránulos de *Lacandonia*".

En el espacio inter y pericromatiniano de *L. schismatica* se encuentran abundantes gránulos con un tamaño (323 nm) y distribución intermedia al de los inter y pericromatinianos, ya que se encuentran indistintamente en la región inter y pericromatiniana del núcleo. Carecen del halo claro que

caracteriza a los gránulos pericromatinianos y forman cúmulos de abundantes gránulos lo cual no es característico de los GICs de las plantas. Son EDTA positivos, lo cual sugiere su naturaleza ribonucleoproteica. Por sus características, son partículas diferentes a los GICs y GPCs de animales y plantas por lo que reciben el nombre de "gránulos de *Lacandonia*" (Jiménez García et al 1992). Los estudios comparativos del núcleo en interfase de *L. schismatica* con otras especies del orden Triuridales (*Triuris brevistylis*) y otras plantas saprófitas (*Voyria aphylla* y *Gymnosiphon divaricatus*) indican que las estructuras anulares mencionadas anteriormente, se encuentran en todas las plantas estudiadas. Sin embargo, las estructuras tipo complejo sinaptonémico y los "gránulos de *Lacandonia*" son características privativas de las dos especies primeramente mencionadas, lo cual apoya un origen monofilético para ambas (Jiménez García et al 1992). Los "gránulos de *Lacandonia*" son el rasgo distintivo de *L. schismatica* y *Triuris brevistylis* y objeto de estudio en el presente trabajo.

Esta investigación está enfocada al estudio citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural de los "gránulos de *Lacandonia*". Con este propósito, se utilizó el método de oxinitrato de bismuto (Locke & Huie 1977, Brown & Lucke 1978), preferencial para gránulos intercromatinianos que contrasta compuestos fosforilados, en especial fosfoproteínas, y la

técnica de inmunolocalización de los snuRNPs utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (Y-12), que reconoce un epítipo común a las partículas ribonucleoproteicas que contienen los RNAs U1, U2, U4, U5 y U6 (anti-Sm) y que marca los gránulos intercromatinianos de animales y plantas, así como las fibras ribonucleoproteicas en los sitios de transcripción. Las técnicas antes mencionadas se aplicaron con el fin determinar si los "gránulos de *Lacandonia*" son estructuras equivalentes a los GICs descritos para animales y plantas, en cuanto a su comportamiento citoquímico e inmunocitoquímico.

III. OBJETIVO

Determinar si los "gránulos de *Lacandonia*" son estructuras equivalentes a los gránulos intercromatinianos de animales y plantas por su comportamiento citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural, empleando dos marcadores de los mismos: 1) el oxinitrato de bismuto y 2) la inmunolocalización con anticuerpos dirigidos contra los snRNPs.

IV. METODOLOGIA

Para la realización del presente trabajo se llevaron a cabo dos salidas a la Selva Lacandona (Chiapas, México) en las cuales se colectaron plantas de *L. schismatica*. Estas fueron transportadas vivas (en cajas de plástico con parte del suelo y cubiertas de hojarasca) al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM en donde se inició su procesamiento. Se seleccionaron botones florales y flores en diferentes etapas del desarrollo.

. Preparación del Tejido Para la Técnica de Impregnación con Bismuto en bloque (Pre-inclusión).

Se cortaron fragmentos pequeños de botones florales y flores dentro de una solución fijadora de glutaraldehído al 6% en buffer de cacodilatos 0.05M a pH 7.4, aplicando vacío durante 2 a 3 minutos. La fijación se llevó a cabo a temperatura ambiente por espacio de una hora. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con buffer de cacodilatos 0.05M conteniendo 10% de sacarosa, a pH 7.4. Se realizaron varios cambios durante quince minutos. Los fragmentos de botones florales y flores se colocaron en buffer de Trietanolamina-HCl 0.1M, a pH 7.0 y a 4°C, durante media hora. Se llevaron a cabo dos cambios de quince minutos cada uno.

Técnica de Oxinitrato de Bismuto

La solución de tinción se preparó de acuerdo a Locke & Huie (1977). Solución A. Oxinitrato de bismuto Se disolvieron 400 mg de tartrato de sodio en 10 ml de NaOH 1N. A esta solución se le agregaron 200 mg de oxinitrato de bismuto. Solución B. Buffer de trietanolamina Buffer de Trietanolamina-HCl 0.2M a pH 7.0 Para obtener la solución de tinción con bismuto se agregó la solución B a la solución A en una proporción 2:1. El pH se ajustó a 7.0 con HCl.

Los fragmentos de tejidos se colocaron en un frasco conteniendo esta solución, agitando lentamente por espacio de una hora a temperatura ambiente.

Después de la tinción con bismuto el tejido se lavó con buffer de Trietanolamina-HCl 0.1M a pH 7.0 haciendo varios cambios durante treinta minutos. Posteriormente, los tejidos se postfijaron con Tetraóxido de Osmio 1% en buffer de cacodilatos 0.05M, conteniendo sacarosa al 4% a pH 7.2 por una hora. Posteriormente, se enjuagaron en buffer de cacodilatos haciendo tres cambios durante 15 minutos. La deshidratación se llevó a cabo con alcoholes graduales del 30%, 50%, 70%, 80%, 96% (durante diez minutos en cada uno) y con el de 100% (durante quince minutos, con cambios de 5 minutos cada uno). Se

hicieron tres cambios de cinco minutos cada uno con óxido de propileno. Posteriormente, las muestras se colocaron en una mezcla homogénea de óxido de propileno-resina epóxica en una proporción de 1:1 durante toda la noche. Las muestras se incluyeron en resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60°C 24 hs (Diagrama de flujo No 1).

Se obtuvieron cortes semifinos, de 0.5 μm de grosor, para localizar los tegumentos del óvulo y posteriormente, se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de grosor en un ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT2, los cuales se montaron sobre rejillas de cobre que se observaron sin tinción adicional a la del oxinitrato de bismuto, en un Microscopio Electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 60 Kv.

Técnica de Oxinitrato de Bismuto en corte (Post-Inclusión).

Se cortaron pequeños fragmentos de botones florales y flores en unas gotas de la solución fijadora preparada a partir de glutaraldehído al 6% y buffer de cacodilatos 0.05M, pH 7.4. Posteriormente, se colocaron en un frasco conteniendo esta solución. Se aplicó vacío durante dos a tres minutos, después de lo cual se fijaron las muestras durante una hora. Transcurrido el tiempo, se hicieron varios cambios con buffer de cacodilatos 0.05M a pH 7.4. El procesamiento de

deshidratación e inclusión se muestra en el diagrama de flujo No.2 al final de esta sección.

Se obtuvieron cortes ultrafinos, de 60 a 90 nm de grosor, del tegumento del óvulo. El montaje se realizó sobre rejillas de cobre y se contrastaron, por flotación, sobre una gota de la solución de contraste, durante una hora, en una cámara húmeda que contenía lentes de hidróxido de sodio. Posteriormente, las rejillas se enjuagaron con agua bidestilada y se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 60 Kv. Para preparar la solución de contraste se procedió como ya se mencionó anteriormente.

En los experimentos de tinción con bismuto, pre-inclusión y post-inclusión, se incluyó un control positivo de hepatocitos de rata. Las muestras de hígado de rata se procesaron en forma simultánea y de la misma forma que las muestras de *L. schismatica*.

Preparación de las Muestras Para la Técnica de Inmunolocalización en corte (Post-Inclusión).

Los botones florales y flores de *L. schismatica* se cortaron en fragmentos pequeños, dentro de unas gotas de la solución fijadora de paraformaldehído al 4%-glutaraldehído al 1% en buffer de fosfatos 0.16M a pH 7.2. Las muestras se colocaron,

inmediatamente después, en un frasco con la solución fijadora y se aplicó vacío de dos a tres minutos. Posteriormente, se llevaron a cabo varios cambios con buffer de fosfatos durante quince minutos. La deshidratación se llevó a cabo en alcoholes graduales del 30%, 50%, 70%, 90% (una hora en cada alcohol) y en el de 100% (tres cambios de una hora cada uno). Las muestras se colocaron en una mezcla homogénea de dos partes de alcohol absoluto y una parte de la resina acrílica hidrosoluble LR White, por espacio de tres horas, después de lo cual se colocaron en una solución de alcohol absoluto-LRW en una proporción 1:2 por tres horas y posteriormente, en LRW durante 24 horas. Se hicieron varios cambios de una hora cada uno con LRW y por último las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina con resina LRW en una estufa a 60°C durante 20 horas. El procedimiento de deshidratación e infiltración se llevó a cabo a 4°C.

Se obtuvieron cortes de 60 a 90 nm de grosor del tegumento del óvulo en un ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT2 y se montaron sobre rejillas de níquel.

Técnica de inmunolocalización Post-inclusión

Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo anti-Sm monoclonal de ratón (Y12). El anticuerpo secundario utilizado

fué una inmunoglobulina de ratón-anti cabra unida a partículas de oro coloidal de 10 ó 15 nm.

Para la técnica de inmunolocalización se emplearon cortes con un pretratamiento con H_2O_2 , en el cual, los cortes montados en rejillas de níquel se flotaron 10 minutos en H_2O_2 al 10%, se lavaron tres veces en agua bidestilada por flotación. Posteriormente, se lavaron por goteo y después se flotaron 5 minutos en agua bidestilada. Además, se emplearon cortes montados en rejillas de níquel sin un tratamiento previo al inmunomarcaje.

En ambos casos, las rejillas se flotaron 3 minutos en Suero Normal de Cabra (Normal Goat Serum, NGS) diluido 1:50 en PBS (buffer de fosfatos salino) a pH 7.3. Posteriormente, se eliminó el exceso de NGS con papel filtro. Los cortes montados en las rejillas se incubaron, 17 horas a $4^{\circ}C$, en gotas de 10 μl del primer anticuerpo diluido 1:10 en PBS-Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1 mg/ml-Tween 20 0.05% (5 μl /10 ml). Al día siguiente las rejillas se lavaron con PBS por goteo, se flotaron 15 minutos en PBS y se flotaron 3 minutos en NGS diluido en PBS 1:50. Posteriormente, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en gotas del segundo anticuerpo diluido 1:20 en PBS, después de lo cual, se lavaron por goteo con PBS, se flotaron 15 minutos con PBS y se gotearon nuevamente con

PBS. Por último, se lavaron con agua bidestilada con piseta y se flotaron 15 minutos en agua bidestilada (Ver diagrama de flujo No.3 al final de esta sección).

Como un control de la especificidad del marcaje, en algunas rejillas se omitió la incubación en el primer anticuerpo. En este caso, las rejillas se incubaron en PBS-Tween por 17 horas, después de lo cual se procedió de la misma forma que para las rejillas incubadas en el primer anticuerpo.

Después de la técnica de inmunolocalización, las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo con un tiempo de contraste de 20 y 10 minutos, respectivamente, y por último, se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 60 Kv.

TINCION CON BISMUTO EN BLOQUE

Fragmentos pequeños de botones florales y flores	
Fijación en glutaraldehído al 6% en buffer de cacodilatos 0.05 M a pH 7.4	1 hora a temp. amb.
Lavados en buffer de cacodilatos 0.05 M con 10% de sacarosa a pH 7.4	15-30 min varios cambios
Lavados en buffer de Trietanolamina-HCl 0.1 M a pH 7.0 (en frío)	1/2 hora 2 cambios
-Tinción de Bismuto-	1 hora a temp. amb.
Lavar con Trietanolamina-HCl 0.1 M a pH 7.0	30 min varios cambios
Post-fijación en OsO ₄ al 1% en buffer de cacodilatos 0.05 M con 4% sacarosa a pH 7.2	1 hora
Enjuagar con cacodilatos 0.05 M con 4% sacarosa a pH 7.2	15 min
Deshidratación	
Oxido de propileno	15 min
Preinclusión en óxido de propileno-resina epóxica en una proporción 1:1	noche
Inclusión en resina epóxica	
Polimerización a 60°C	24 horas

D I A G R A M A D E F L U J O N O . 1

TINCION CON BISMUTO EN CORTE

Fragmentos pequeños de botones florales y flores

FIJACION.- en glutaraldehído al 6% en buffer 1 hora a
de cacodilatos 0.05 M a pH 7.4 temp. amb.

Lavados en buffer de cacodilatos 0.05 M 15-30 min
con 10% de sacarosa a pH 7.4 varios
cambios

DESHIDRATACION.- a 4°C

etanol 30 %	1 hora
etanol 50 %	1 hora
etanol 70 %	1 hora
etanol 90 %	1 hora
etanol 100 %	3 horas

(tres cambios)

INFILTRACION a 4°C en Etanol 100%-LRWhite 2:1 3 horas
Etanol 100%-LRWhite 1:2 3 horas
LRWhite 24 horas
(Tres cambios) LRWhite 3 horas

INCLUSION en LRWhite en cápsulas de gelatina

POLIMERIZACION a 60°C durante 20 horas

D I A G R A M A D E F L U J O N C . 2

PREPARACION DEL TEJIDO PARA
INMUNOLOCALIZACION

FIJACION

Paraformaldehido 4%-Glutaraldehido 1%
en Buffer de Fosfatos 0.5M pH 7.

Enjuages en Buffer de Fosfatos

DESHIDRATACION

Etanol 30% 1 hora a 4°C

"	50%	"	
"	70%	"	
"	90%	"	
"	100%	"	(tres veces)

INFILTRACION

Etanol 100%-resina IR White 2:1 3 horas a 4°C
Etanol 100%-resina LR White 1:1 3 horas
Etanol 100%-resina LR White 1:2 24 horas
resina LR White 24 horas
Tres cambios de 1 hora cada uno con LR White

INCLUSION

POLIMERIZACION

a 60°C por 20 horas en estufa

D I A G R A M A D E F L U J O N O . 3

V. RESULTADOS

"Gránulos de *Lacandonia*"

La figura 2 muestra la ubicación de un núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica*, dentro de un botón floral, por medio de microscopía de luz. En la figura 2b se ilustra, a bajo aumento, un panorama de un botón floral en corte longitudinal. La llave indica la parte del mismo botón que se muestra aumentada en 2a. La figura 2a muestra, con objetivo de inmersión, el mismo corte, en el que se aprecia el tipo de núcleo y los diferentes elementos histológicos del botón floral. La flecha indica el núcleo que se observa aumentado en la figura 2c. En la figura 2c se observa el tipo de cromatina reticulado, los nucléolos y la flecha señala el espacio intercromatiniano en donde se localizan los "gránulos de *Lacandonia*".

En la figura 3 se ilustra con micrografías electrónicas, la localización y ultraestructura de los "gránulos de *Lacandonia*". En el recuadro se observan los "gránulos de *Lacandonia*", entre hebras de cromatina reticulada, con técnicas de microscopía electrónica convencional de fijación con glutaraldehído, postfijación con OsO_4 , inclusión en epón y contraste con acetato de uranilo y citrato de

FIG. 2B. CORTE LONGITUDINAL DE UN BOTON FLORAL EN EL QUE SE OBSERVAN DOS CARPELOS, PARTE DEL TEPALO Y EL RECEPTACULO. TINCION CON AZUL DE TOLUIDINA. 160 X

FIG. 2A. EL OVULO ENMARCADO EN UNA LLAVE EN LA FIGURA ANTERIOR A MAYOR AUMENTO. SE APRECIAN DOS CAPAS CELULARES EXTERNAS QUE CORRESPONDEN A LA PARED DEL OVARIO (P); DOS CAPAS CELULARES DEL TEGUMENTO EXTERNO (TE); DOS CAPAS DEL TEGUMENTO INTERNO (TI) Y EL SACO EMBRIONARIO (SE). 1071 X

FIG. 2C. EL NUCLEO DEL TEGUMENTO EXTERNO SEÑALADO CON LA FLECHA GRUESA, A MAYOR AUMENTO. SE APRECIA EL RETICULO DE CROMATINA Y DOS NUCLEOLOS ESFERICOS COMPACTOS. LA FLECHA DELGADA SEÑALA LA REGION ENTRE LA CROMATINA COMPACTA, LUGAR DONDE SE LOCALIZAN LOS "Gránulos de *Lacandonia*". 2850 X

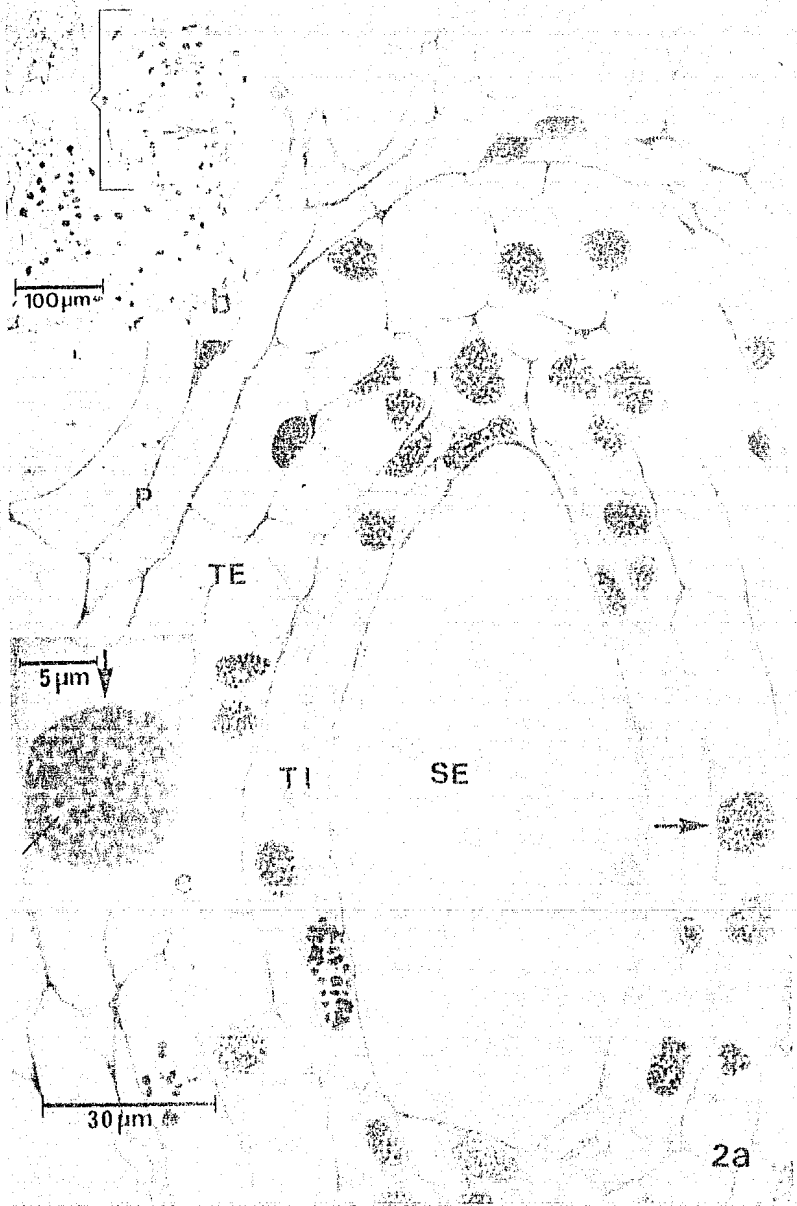
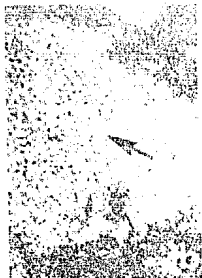
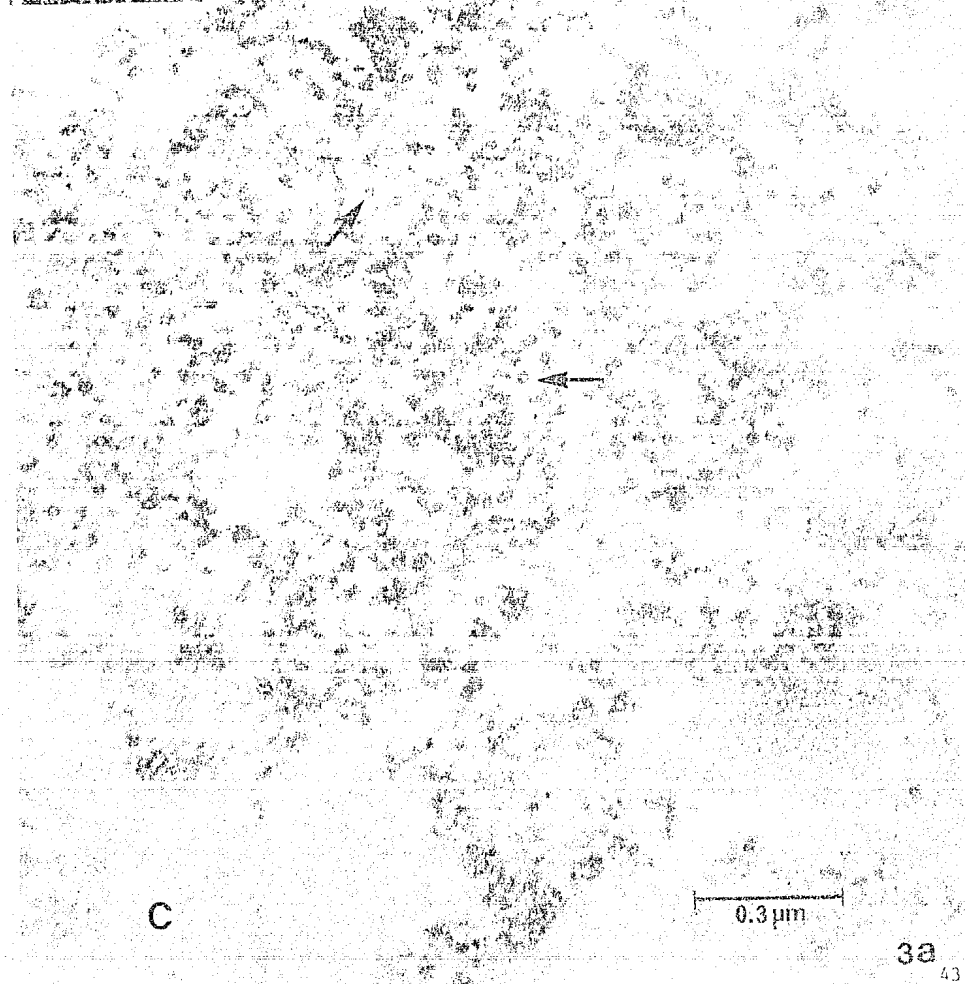


FIG. 3A. LA REGION INTERCROMATINIANA SEÑALADA CON LA FLECHA DELGADA EN LA FIGURA 1C A GRAN AUMENTO. SE OBSERVAN LOS "Gránulos de *Lacandonia*" (FLECHAS) EN EL ESPACIO INTER Y PERICROMATINIANO CONTRASTADOS CON LA TECNICA PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS DE BERNHARD. LA CROMATINA (C) SE BLANQUEA CON ESTA TECNICA. 91 000 X

FIG. 3B. LOS "Gránulos de *Lacandonia*" CONTRASTADOS CON LA TECNICA CONVENCIONAL PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO. 38 000 X



C



0.3 μm

3a
43

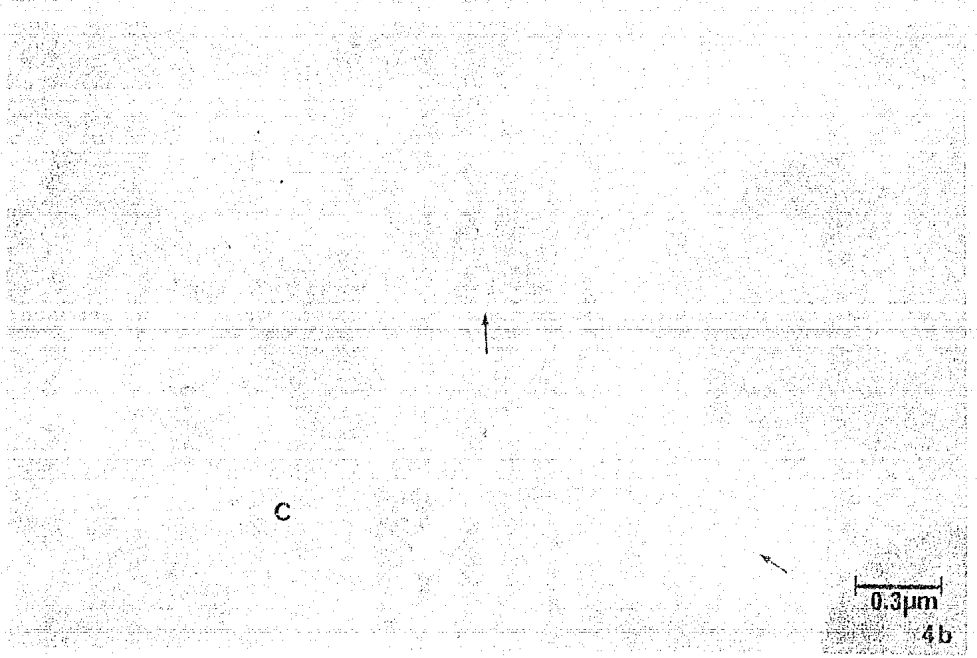
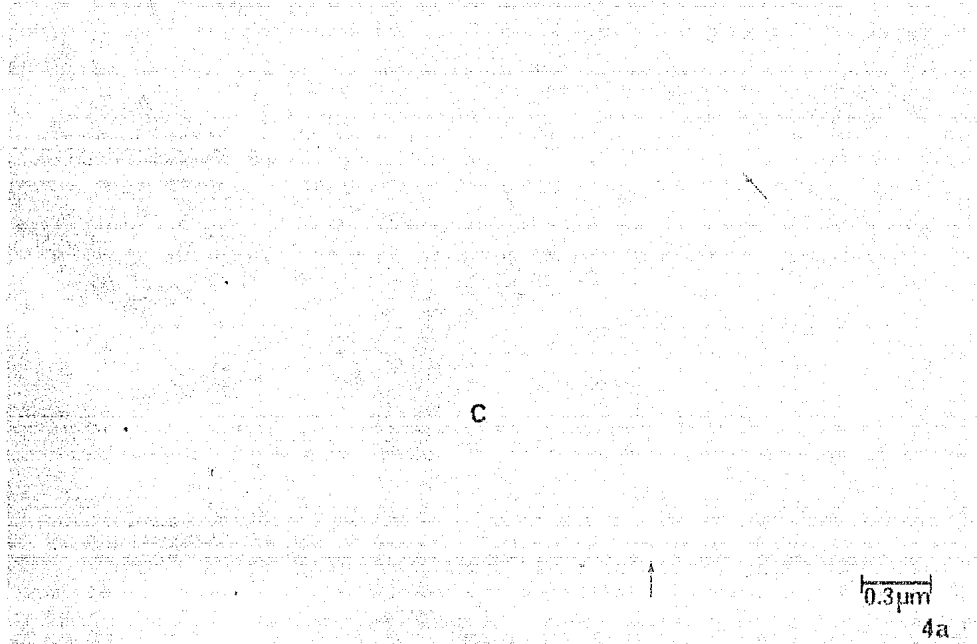
plomo. En mayor aumento, se observan los "gránulos de *Lacandonia* preferencial para RNPs. La cromatina aparece sin contraste.

Método de Oxinitrato de Bismuto preferencial para GICs

Las observaciones realizadas al microscopio electrónico de los núcleos contrastados con el método de oxinitrato de bismuto pre-inclusión y post-inclusión indican que las únicas estructuras nucleares teñidas, al aplicar esta técnica, son las fibras pericromatinianas y pequeños gránulos con un diámetro menor al de los "gránulos de *Lacandonia*" que se encuentran dispersos en el espacio intercromatiniano (Figs 4a; 4b y 5a). Los gránulos de *Lacandonia* no se tiñen con esta técnica y se observan con un contraste bajo entremezclados con fibras y algunos gránulos positivos al oxinitrato de bismuto. Su contraste es similar al de la cromatina, es decir, negativos. Sin embargo, se realizaron algunas observaciones en las cuales se tiñe la periferia de los "gránulos de *Lacandonia*" con este procedimiento. Esta zona periférica rodea a los gránulos los cuales permanecen con bajo contraste similar al de la cromatina.

Como controles positivos se utilizaron núcleos de hígado de rata. La tinción se llevó a cabo de manera simultánea al de los núcleos de *L. schismatica*. En núcleos de hepatocitos se

FIGS. 4A; 4B Y 5A.-CONTRASTE CON OXINITRATO DE BISMUTO EN NUCLEOS DE *L. schismatica*. ESTA TECNICA CONTRASTA COMPUESTOS FOSFORILADOS, EN ESPECIAL FOSFOPROTEINAS. A) SECCION DE NUCLEOS DE *L. schismatica*. LOS "Gránulos de *Lacandonia*" (FLECHAS) APARECEN DE LA MISMA INTENSIDAD DE GRIS QUE LA CROMATINA (C), ES DECIR, SON NEGATIVOS. SIN EMBARGO, ALGUNOS DE ELLOS PRESENTAN UNA ZONA PERIFERICA QUE RODEA A LOS GRANULOS QUE ES POSITIVA A LA TECNICA (✓). 4A.- 41 600 X 4B.- 49 600 X 5A.- 65 000 X. FIG 5B.-CONTROL POSITIVO DE UN NUCLEO DE HIGADO DE RATA. SE OBSERVAN CONTRASTADOS LOS GRANULOS INTERCROMATINIANOS (GI) Y PERICROMATINIANOS (CABEZAS DE FLECHA). LA CROMATINA (C) SE OBSERVA ACLARADA Y EL NUCLEOLO (n) CON MUY BAJO CONTRASTE. 71 000 X





4c

c

0.3 μm

5a



n

c



GI

0.3 μm

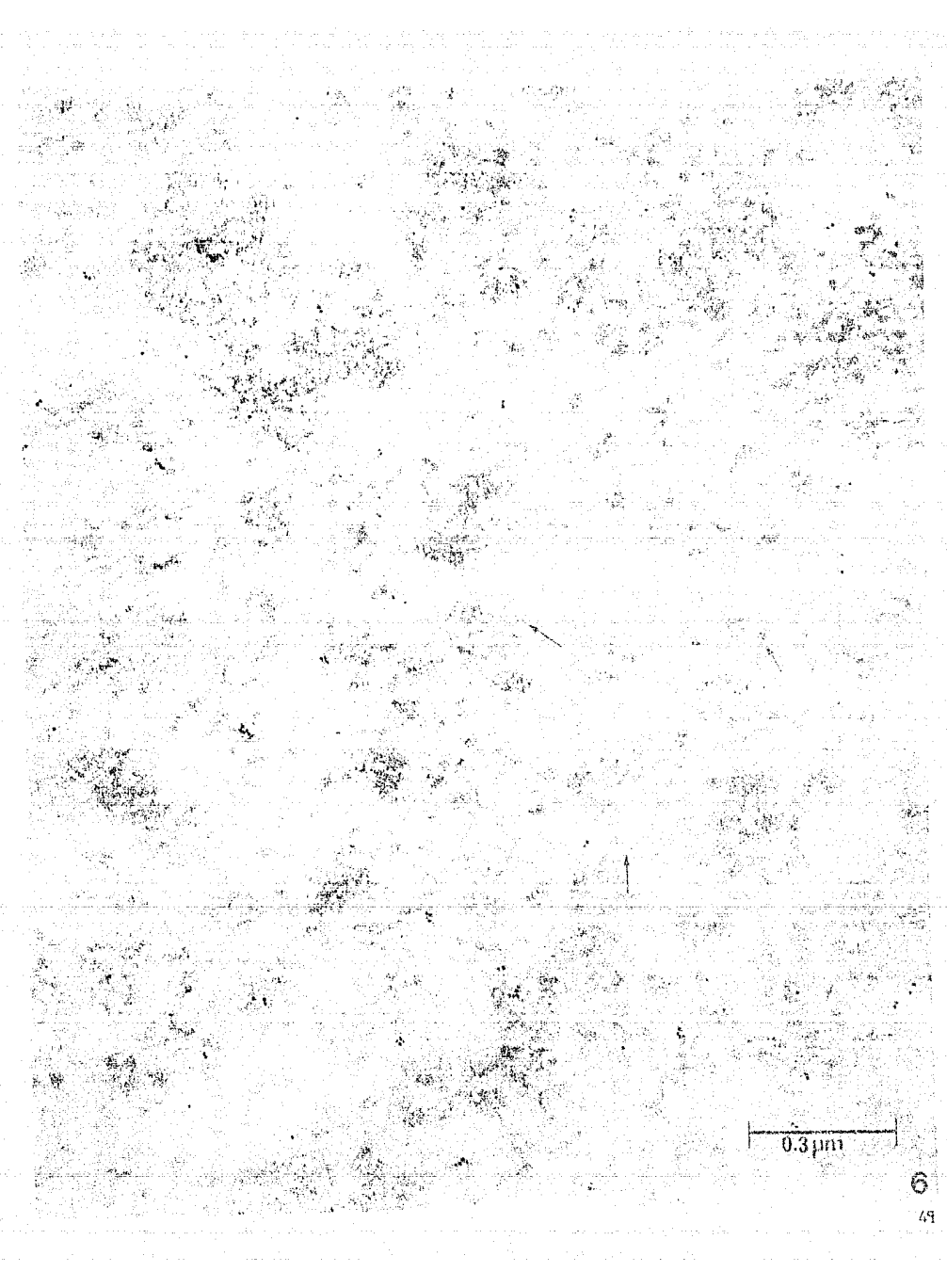
5b 46

contrastaron los gránulos intercromatinianos, aunque también mostraron positividad los gránulos pericromatinianos. Estos últimos obtuvieron la misma intensidad de contraste que los cúmulos de gránulos intercromatinianos. Por el contrario, la cromatina compacta se observó sin contraste y el nucleolo con muy bajo contraste (Fig 5b). Los controles positivos al oxinitrato de bismuto en los cuales se tiñeron los GICs, corroboran las observaciones que indican que los "gránulos de *Lacandonia*" son negativos al método de oxinitrato de bismuto y que, ocasionalmente, estos pueden estar rodeados de una zona periférica que es positiva a la técnica.

Método de inmunolocalización de los snRNPs

Al incubar los cortes ultrafinos con el anticuerpo anti-Sm monoclonal de ratón (Y12) e incubar posteriormente con una inmunoglobulina de ratón-anti cabra unido a partículas de oro de 10 ó 15 nm de diámetro, se marcaron las fibras pericromatinianas así como pequeños gránulos en el espacio intercromatiniano. Los "gránulos de *Lacandonia*" (Fig 6) sin embargo, fueron negativos. Estas observaciones son acordes con los resultados obtenidos con el método de oxinitrato de bismuto.

FIG. 6.-INMUNOLOCALIZACION DE snRNPs EN NUCLEOS DE *L. schismatica*. LOS GRANOS DE ORO MARCAN FIBRAS PERICROMATINIANAS MIENTRAS QUE LOS "Gránulos de *Lacandonia*" NO ESTAN MARCADOS (FLECHAS). SE PUEDEN OBSERVAR ALGUNAS PARTICULAS DE ORO EN LA PERIFERIA DE ALGUNOS GRANULOS DE ESTA ESPECIE (CABEZAS DE FLECHA) 100 000 X.



0.3 μm

VII. DISCUSION

En el presente trabajo se muestra que los "gránulos de *Lacandonia*" no son estructuras equivalentes a los gránulos intercromatinianos, ya que no se contrastan con la técnica de oxinitrato de bismuto, que es un marcador que tiñe preferencialmente los GICs de animales (Wassef 1979; Gass et al. 1984) y plantas (Medina et al. 1989; Moreno Díaz de la Espina et al. 1992). Además, el inmunomarcaje con el anticuerpo Y-12 indica que los snRNPs en los núcleos interfásicos de *L. schismatica* están asociados a las fibras pericromatinianas las que, a su vez, mantienen una relación espacial muy estrecha con los "gránulos de *Lacandonia*". Esta asociación fué observada por Fakan y colaboradores en 1984 en núcleos de hígado de rata y por Vázquez-Nin y colaboradores en 1990 en núcleos politénicos de las glándulas salivales de *Chironomus thummi*. Sin embargo, las snRNPs no parecen ser constituyentes de los "gránulos de *Lacandonia*".

En trabajos anteriores, en los que se utilizaron como herramienta de estudio las técnicas convencionales para microscopía electrónica (acetato de uranilo-citrato de plomo), se pusieron de manifiesto diferencias marcadas de los "gránulos de *Lacandonia*" con respecto a los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos en cuanto a tamaño, distribución y abundancia. Se observó que forman cúmulos, a

diferencia de los GICs descritos para plantas (Jiménez-García et al. 1989; Medina et al. 1989). Su tamaño es mayor al de los GIC y además, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que carecen de algunos factores de splicing, como los snRNPs, que caracterizan a los GICs típicos (Fakan et al 1984). En la tabla No. 1 se resumen las características ultraestructurales, citoquímicas e inmunocitoquímicas de los "gránulos de *Lacandonia*" y los GICs.

Para el estudio de los "gránulos de *Lacandonia*" es necesario emplear herramientas de estudio que abarquen el uso de la microscopía electrónica con técnicas de alta especificidad, como la autorradiografía ultraestructural, utilizando como marcador la uridina tritiada lo cual ayudará a conocer la ruta de producción del ARN y los sitios de donde ocurre la síntesis primaria del ARN. Además, es necesario aislar y determinar el contenido de los "gránulos de *Lacandonia*" mediante técnicas bioquímicas para determinar su función citofisiológica en el metabolismo nuclear de *L. schismatica*.

Por la estrecha relación de las fibras pericromatinianas con los "gránulos de *Lacandonia*", y su comportamiento citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural, sugerimos que ambas estructuras, en *L. schismatica*, semejan las relaciones observadas entre las fibras pericromatinianas y los gránulos de Balbiani en *Chironomus thummi*. En particular, proponemos

que los "gránulos de *Lacandonia*" pueden estar implicados en el metabolismo de ARN mensajero ya maduro.

		GICs	"Gránulos de <i>Lacandonia</i> "
ULTRAESTRUCTURA	TAMANO	Partículas Polimórficas de 20-25 nm	Partículas esféricas de 32±3 nm
	DISTRIBUCION	espacio inter-cromatiniano	espacio inter y pericromatiniano
	ABUNDANCIA	Núcleos vegetales: no forman cúmulos Núcleos animales: Forman cúmulos	Forman cúmulos de abundantes gránulos
COMPORTAMIENTO CITOQUIMICO E INMUNOCITOQUIMICO	TECNICA DE BERNHARD	Positivos	Positivos
	OXINITRATO DE BISMUTO	Positivos	Negativos
	INMUNOMARCAJE con anti-Sm	Se marcan los GICs y las FPCs	No se marcan los gránulos. Se marcan las FPCs.

Tabla I. Comparación de los GICs y los "gránulos de *Lacandonia*" en cuanto a su ultraestructura y su comportamiento citoquímico e

VII. CONCLUSTONES

Los "gránulos de *Lacandonia*" no son estructuras equivalentes a los gránulos intercromatinianos universalmente presentes en animales, plantas y hongos, ya que su comportamiento citoquímico e inmunocitoquímico no corresponde al de estas partículas ribonucleoproteicas.

Las snRNPs no parecen ser elementos constitutivos de los "gránulos de *Lacandonia*", sino que están asociadas a las fibras pericromatinianas, es decir, a los sitios de alta transcripción de pre-mRNA.

Es necesario aislar los "gránulos de *Lacandonia*" mediante técnicas bioquímicas para tratar de entender su papel citofisiológico en el metabolismo nuclear y llevar a cabo estudios autorradiográficos que permitan conocer la ruta de producción del ARN en los núcleos de *L. schismatica*.

VIII. REFERENCIAS

Agredano, M.L.T. 1991. Estudio ultraestructural comparativo del núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C.H. Ramos (Triuridales: Lacandoniaceae) y *Triuris alata* Brade (Triuridales: Triuridaceae). Tesis, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México

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

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

Bachelletre, J., Puvion E., Zalta, J.P. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *J. Biochem* 58:327-337

Berezney, R., 1979. Dynamic properties of the nuclear matrix. En Busch, H. (ed.). *The cell nucleus*. Academic Press, New York pp 413-45

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

Brasch, K. & Ochs, R.L. 1992. Nuclear bodies (NBS): A newly "rediscovered" organelle. Experimental Cell Research. 202:211-223

Brown, G. L., Locke, M., 1978. Nucleoprotein localization by bismuth staining. Tissue Cell 10:365-388

Cajal, S.R. 1903. Un sencillo método de coloración del reticulo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos. Trab. Lab. Invest. Biol. 2:129-221.

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 pp 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
Dilcher, D. & Crane, P. R. 1984. In pursuit of the first flower. Natural History 3/84: 57-60

Fakan, S. & Bernhard, W. 1973. Nuclear labelling after prolonged ³H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. Exp. Cell Res. 79:431-444.

Fakan, S., Puvion, E., Spohr, G. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated hepatocytes. Exptl. Cell. Res. 99:155-164

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 filaments proteins: a growing multigene family. Cell 48:3-4

Gas, N., Inchauspé G., Azum, M.C., Stevens, B., 1984. Bismuth staining of a nucleolar protein. Experimental Cell Research. 151:447-457.

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 nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.

Jiménez-García, L.F., Elizmundia, 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 protocists. *BioSystems*. 22:103-116

Jiménez-García, L.F., Agredano, M.L.T., Segura, V.M.L., Vázquez-Nin G.H., Echeverría, O.M., Ramos, C.H., Martínez E. 1990(a). El núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C.H. Ramos II. Partículas Ribonucleoproteicas. XI Congreso Mexicano de Botánica, Oaxtepec, Morelos, México

Jiménez-García, L.F., Segura, V.M.L., Agredano, M.L.T., González, M.A., Echeverría, M.O., Vázquez-Nin, G.H., Ramos, C.H., Martínez, E. 1990(b). The nucleus of *Lacandonia schismatica* a key species for flower evolution. Tercer Congreso Europeo de Biología Celular, Florencia, Italia.

Jiménez-García, L.F., Agredano, M.L.T., Segura, V.M.L., Echeverría, O.M., Ramos, C.H., Martínez, E., Vázquez-Nin, G.H. 1991. "Non-typical RNPs granules in the nucleus of *Lacandonia schismatica* 12th European Workshop on the Cell Nucleus, Les Diablerets, Suiza.

Jiménez-García, L. F., Agredano, M.L.T., Segura, V.M.L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H., Vázquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biology of the Cell* 75:101-110

Jordan, E.G. 1976. Nuclear structure in *Daucus carota* L. *Cytobiologie* 14:171-177

Jordan, E.G., Timmis J.N. Trewavas A.J. 1980 The plant nucleus. In: Tolbert NE (ed) *The biochemistry of plants.1. The plant cell*. Academic Press, New York London, pp 489-588

Kryzowska-Gruca, S., Zburek 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

ESTOY EN EL
SABER DE LA UNIVERSIDAD

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

Lafontaine, J.G. 1974. Ultrastructural organization of plant cell nuclei. In the Cell Nucleus (H. Busch ed) Vol. 1, Academic Press, New York pp 149-185

Lafontaine, J.G., Luck, B.T. 1980. An ultrastructural study of plant cell (*Allium porrum*) centromeres. J Ultrastruct. Res. 70:298-307

Locke, M. & Huie, P. 1977. Bismuth staining for light and electron microscopy. Tissue & Cell. 9:347-371

Luck, B.T. & Lafontaine J.G. 1980. An ultracytochemical study of nuclear organization in meristematic plant cells (*Allium porrum*). J. Cell Sci. 43:37-58

Luck, B.T., Lafontaine, J.G. 1982. An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cells (*Ciser arietinum*). Can J. Bot 60:611-619

Luck, B.T., Lafontaine, J.G. 1983. An ultracytochemical study of the nucleoplasm in meristematic plant cell (*Allium porrum*) interphase nuclei. Can. J. Bot. 61:2554-2565

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

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

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

Medina, M., Moreno, S., Martín, M., & Fernández-Gómez, M. 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. Biology of the Cell. 67:331-339

Moens, P.B., Church K. 1977. Centromere sizes position and movements in the interphase nucleus. Chromosoma 61:41-48

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

Moreno Díaz de la Espina, S., Risueño, M.C. 1977. Fibrillar bodies in *Allium cepa*: an ultrastructural and cytochemical

study. *Biologie Cellulaire*. 30:93-102

Moreno Díaz 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

Moreno Díaz de la Espina S., Mínguez A., Vázquez-Nin G.H., Echeverría, O.M. 1992. Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. *Chromosoma*. 101:311-321

Motte, M.P., Loppes, R., Menager, M., Deltour, R., 1991. Three-dimensional Electron Microscopy of Ribosomal Chromatin in two Higher Plants: A Cytochemical, Immunocytochemical, and In Situ Hybridization Approach. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 39:1495-1506

Palacios, M.S. & Pérez, S.E. 1993. Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae, a new saprophytic Angiospermae family. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* No 1. en prensa.

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

Quiroz Choperena, S.P., 1990: Estudio estructural del desarrollo del microsporangio de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Tesis, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.

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

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

Spector, D.L., Lark, G., Huang, S. 1992. Differences in snRNP localization between transformed and nontransformed cells. *Molecular Biology of the Cell* 3:555-569

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

Takhtajan, A., 1969: Flowering plants. Origen 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., Echeverría, O.M., Fakan, S., Leser G., Martin, T.E. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus Thummi*. Chromosoma. 99:44-51

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Jiménez-García, L.F., Agredano, M.L.T., Segura, V.M.L., Ramos, C.H. Martínez, E. 1992. La Microscopía Electrónica ofrece nuevas claves sobre la evolución de las plantas primitivas (Triuridales). 1er Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica, Mérida, Venezuela.

Vázquez, S.S. 1992. Estudio estructural e histoquímico de *Lacandonia schismatica* Martínez-Ramos (Lacandoniaceae). Familia, Genero y especie nuevos para la ciencia. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, U.N.A.N. México

Wassef, M. 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. J. Ultrastruct. Res. 69:121-133.

Watson, M.L. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. J. Cell Biol. 13:162-167