



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

00781
9
2ej
1974

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO MORFOLOGICO COMPARATIVO
DE NUCLEOS INTERFASICOS DE VEGETALES
PERTENECIENTES A GRUPOS TAXONOMICOS
DE DIFERENTES NIVELES EVOLUTIVOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P E S E N T A

BERNARDINO LOPEZ ZAMORANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRIA MARTINEZ

**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 esta 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.

A la memoria del

Ing. Bernardino López Real

**"...ni luz, ni llanto, ni luto, ni nada más
ahí, junto a mi cruz
yo sólo quiero paz."**

A mi madre:

Ma. del Refugio Zamorano

A mi esposa:

Silvia Valdez Aragón

A mis hijas:

**Silvia Karina
Luz Iris Encida
Sol Eréndira**

A mis hermanos

**Eduardo
Doralba
Santiago
Martha Guadalupe
Juan Alberto
Octavio**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA las posibilidades de desarrollo que me ha dado.

A la Dra. Olga M. Echeverría por sus enseñanzas, la oportunidad de compartir un espacio en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la UNAM y la dirección de esta tesis.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin por su ejemplo y enseñanzas.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez por su valioso apoyo y amistad.

A los miembros del jurado: Dr. Jorge González González, Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, Dra. Clara Esquivel H., Dra. Olga M. Echeverría, Dr. Luis Felipe Jiménez G., Dra. María Cristina Amador y Dra. Alejandra Mainero del Paso; por la revisión, sugerencias y corrección al escrito.

A mis compañeros del Laboratorio de Microscopia Electrónica: Lourdes Segura V., Guadalupe Zavala, Lourdes T. Agredano, Ernestina U. Pérez, Rosario Ortiz, J. Manuel Elizundia A. y Marco A. González.

Finalmente agradezco muy especialmente a mis suegros Ramona Aragón de V. y José León Valdez V. por su apoyo en todo momento.

MORPHOLOGY COMPARATIVE STUDY OF INTERPHASE NUCLEUS OF PLANTS
BELONGING TO TAXONOMIC GROUPS OF DIFFERENT EVOLUTIONARY LEVELS

SUMMARY

In this work were studied the morphology of the interphase nucleus of *Ulva lactuca*, *Psilotum nudum*, *Marattia laxa*, *Ceratizamia mexicana*, *Taraxacum officinalis*, *Zea mays* and cells meristematics of *Allium sepa*. These vegetable species belong to taxonomic groups of different evolutionary levels.

For the study of the nucleus, the material selected was fixed with a mixture of paraformaldehyde 3.4% and glutaraldehyde 6.4% in part equal using 4.5 ml. of piperazine N-N bis (acid 2-ethanol sulfonic) 0.08 M. during 24 hrs. to 4 °C, was dehydrated with ethanol or with acetone; some embedded were effected in Epon, others in Spurr and others more in glycol methacrilate. The biological material embedded in the resin was fragmented in courts smaller to 90 Å. Some courts were stained with uranyl acetate and lead citrate, others through the preferential staining method for ribonucleoproteins (EDTA) and other samples were stained with 2% phosphotungstic acid for the localization of chromatin. With the electronic transmission microscope, were obtained photographic images of 8,000 to 157,000 increases.

Through the analysis of the photographic images, were determined the characteristics of the structures of the nucleus, as well as the diameter and the numerical density of the perichromatins granules. The volume of the nucleus and nucleolus was calculated as of the measurements effected in preparations made for microscope of light.

It was found that the interphase nucleus maintain a ultrastructure characteristic according to the specie of the vegetables to the fact that belong. The nucleus of the plants of all the evolutionary levels are formed basically with the same structures, but present differences of group to group with respect to its dimensions and morphology. The nuclear structure with more differences morphology observed was the nucleolus and the structures with greater variability in its size were the perichromatin granules, those which presented a volume directly proportional to the volume of the nucleus.

As a rule, the ultrastructure of the plants cells is similar to the of the animal cells, but defer of the protocists, except for the orders of Cryptomonadida and Kinetoplastida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. MARCO TEÓRICO	6
A. Evolución vegetal	6
1. Origen de la vida	6
2. Origen de los eucariontes	11
3. Análisis de secuencias en ADN, ARN y proteínas	15
4. Primeras plantas	18
5. Origen de las plantas terrestres	23
6. Primeras plantas terrestres	25
7. Pteridofitas	27
8. Angiospermas	30
B. Núcleo celular	33
1. Antecedentes históricos.....	33
2. Ciclo celular en eucariontes.....	35
3. Ultraestructura del núcleo interfásico y sus funciones.....	40
a. Envoltura nuclear	41
b. Matriz nuclear.....	44

c. Cromatina	47
d. Estructuras ribonucleoproteicas	59
. Nucleolo	59
. Fibras pericromatinianas	61
. Granos pericromatinianos	61
. Cuerpos espiralados.....	62
. Granos intercromatinianos	63
I. OBJETIVOS	64
III. MATERIAL Y MÉTODO	65
A. Fijación	65
B. Deshidratación	67
C. Preinclusión	68
D. Inclusión	68
E. Corte	70
F. Contraste	71
G. Fotografía	72
H. Análisis de la imagen	72
I. Procesos particulares	73
1. <i>Ulva lactuca</i>	73
2. <i>Ptilotum nudum</i>	74
3. <i>Marattia laxa</i>	74
4. <i>Ceratozamia mexicana</i>	75
5. <i>Taraxacum Officinale</i>	76
6. <i>Allium cepa</i>	77
7. <i>Zea mays</i>	77

8. Análisis cuantitativo	78
a. Diámetro mayor y menor del núcleo y nucleolo.....	78
b. Área nuclear y nucleolar	78
c. Volumen nuclear y nucleolar	79
d. Diámetro de los granos pericromatinianos e intercromatinianos	79
 IV. RESULTADOS	 81
A. <i>Ulva lactuca</i>	81
B. <i>Psilotum nudum</i>	85
C. <i>Marattia laxa</i>	88
D. <i>Ceratozamia mexicana</i>	91
E. <i>Taraxacum officinalis</i>	94
F. <i>Zea mays</i>	96
G. <i>Allium cepa</i>	99
 V. DISCUSIÓN.....	 105
VI. CONCLUSIONES	113
VII. PERSPECTIVAS	115
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 116

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las características ultraestructurales de los núcleos interfásicos de células parenquimatosas de *Ulva lactuca*, *Psilotum nudum*, *Marattia laxa*, *Ceratozamia mexicana*, *Taraxacum officinalis*, *Zea mays* y células meristemáticas de *Allium cepa*. Estas especies vegetales pertenecen a grupos taxonómicos de distintos niveles evolutivos.

Para el estudio de los núcleos, el material seleccionado se fijó con una mezcla de paraformaldehído 3.4% y glutaraldehído 6.4% en partes iguales usando 4.5 ml de piperazina N-N bis (ácido 2-etanol sulfónico) 0.08 M durante 24 hrs a 4 °C, se deshidrató con etanol o con acetona; algunas inclusiones se efectuaron en Epón, otras en Spurr y otras más en glicol metacrilato. El material biológico incluido en la resina se fragmentó en cortes de un grosor menor a 90Å. Unos cortes se contrastaron con uranilo-plomo, otros mediante la técnica de tinción preferencial de ribonucleoproteínas (EDTA) y otros más con la técnica de contrastación de la cromatina. Con el microscopio electrónico de transmisión, se obtuvieron imágenes fotográficas de 8,000 a 157,000 aumentos.

Mediante el análisis de las imágenes fotográficas, se determinaron las características de las estructuras que conforman el núcleo, así como el diámetro y la densidad numérica de los granos pericromatinianos. El volumen del núcleo y nucleolo se calculó a partir de las mediciones efectuadas en preparaciones hechas para microscopía de luz.

Se encontró que los núcleos en interfase mantienen una ultraestructura característica según la especie de los vegetales a que pertenecen. Los núcleos de las plantas de todos los niveles evolutivos están formados básicamente con las mismas estructuras, pero presentan diferencias de grupo a grupo en lo que se refiere a sus dimensiones y morfología. La estructura nuclear en la que más diferencias morfológicas se observaron fue el nucleolo y las estructuras con mayor variabilidad en su tamaño fueron los granos pericromatinianos, los cuales presentaron un volumen directamente proporcional al volumen del núcleo.

En general, la ultraestructura de las células vegetales es similar al de las células animales, pero difieren de los protoctistas, a excepción de los órdenes de Cryptomonadida y Kinetoplastida.

INTRODUCCIÓN

Charles Darwin y Alfred Rusell Wallace presentaron la teoría sobre la evolución de los seres vivos, a través de la selección natural, en sesión celebrada el 1 de julio de 1858 ante la Sociedad Lineana de Londres. Esta teoría ha sido ampliada con las aportaciones de la teoría cromosómica de la herencia, la genética de poblaciones, la idea biológica de especie y otras nociones de biología y paleontología (Mayr, 1978), conformándose así la Teoría Sintética de la Evolución o Teoría Neodarwinista' (Dobzhansky y col., 1988). Luego, los descubrimientos de la genética molecular realizados en las últimas décadas, han dado lugar a otra síntesis que abarca la comprensión de los procesos evolutivos a nivel molecular (Ayala, 1978; Lenski y Mittler, 1993).

Diferentes disciplinas han aportado evidencias sobre la existencia del proceso evolutivo; la embriología, citogenética, biología molecular, inmunología, fisiología y anatomía comparativa, paleontología, etcétera. Los estudios en estas disciplinas han permitido acumular numerosas evidencias que apoyan la evolución orgánica (de Bárbara, 1989). Las pruebas sobre la evolución se resumen en dos tipos: la información sobre la vida pasada que puede leerse en los documentos fósiles y la información que facilitan los seres vivos en la actualidad (Dickerson , 1980).

'La Teoría Sintética de la Evolución se conforma entre los años veintes y cuarentas de los escritos de Theodosius Dobzhansky, Julián Huxley, Bernhard Rensch, Simpson, G Ledyard Stebbins y Ernest Mayr. La teoría se caracteriza por el rechazo de la herencia de los caracteres adquiridos, un énfasis en la condición gradual de la evolución y el reconocimiento de la selección natural junto con las mutaciones génicas, mutaciones cromosómicas, recombinación genética y el aislamiento reproductivo, como los procesos que dirigen a las poblaciones de organismos hacia diferentes canales adaptativos.

Un prerequisite para el cambio evolutivo es la variación genética, reflejada por la existencia de múltiples alelos en una población. Esa variabilidad permite a las poblaciones adaptarse a cambios del medio ambiente. Cuando esas adaptaciones producen cambios graduales en una sola línea de descendencia se da en los organismos una evolución filogenética, pero los cambios pueden dividir a una línea de descendencia en dos o más líneas nuevas dando lugar a la especiación. El proceso evolutivo implica a menudo el origen de nuevas especies (Ayala 1978; Lloyd y Gould , 1993)

A partir de las teorías antes mencionadas, en lo que va de nuestro siglo se han efectuado grandes esfuerzos para encontrar el grado de parentesco entre los grupos de organismos. La mayoría de los métodos para inferir filogenia se basan en una serie de variables comparadas entre taxa. Esas variables pueden ser de carácter cuantitativo, estado morfológico discretamente modificado, frecuencias génicas y secuencia de nucleótidos. En la construcción de árboles filogenéticos, la anatomía comparada ha sido la más utilizada. La disposición de órganos y tejidos en las plantas es el criterio que con más frecuencia se utiliza para inferir su grado de evolución.

No obstante lo mencionado, en los últimos 15 años ha sido de gran utilidad para estos fines la secuenciación y comparación de algunas biomoléculas para determinar el grado de parentesco aún en fósiles (Golenberg y col., 1990; Paubo 1993). Genes de glutamato dehidrogenasa (Benachenhou-Lahfa y col., 1993), de ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa (rbcL) (Bousquet y col 1992); genes de cloroplastos (Raubeson y Jansen, 1992) son ejemplos importantes para el estudio de la filogenia en vegetales.

El interés en los organismos completos o sus órganos, por una parte, o su secuencia de ADN nuclear, por otra, no son por sí solos los métodos más importantes en la búsqueda de los orígenes. Los estudios de la estructura, función y bioquímica de organoides celulares reafirman y aportan también elementos a las teorías evolucionistas.

Mediante la secuenciación de nucleótidos en genes ribosomales de cianobacterias, se han encontrado parentescos entre éstas y los cloroplastos de las plantas superiores (Schwemmler,

1984; Mikelsaar, 1987). Lo mismo se ha hecho en mitocondrias (Mikelsaar, 1987). Los tipos de clorofila han servido para diferenciar grupos de vegetales y al mismo fin ha contribuido el estudio de la morfología del cloroplasto (Sreewart y Mattox, 1975).

Al igual que en los cloroplastos y mitocondrias, el estudio comparativo de estructuras subcelulares pueden aportar elementos al conocimiento de las relaciones filogenéticas entre los vegetales. Las características estructurales finas del núcleo han sido útiles en la taxonomía de las algas verdes sifonadas (Roth y Friedmann, 1982) y se ha confirmado que la proporción de cromatina condensada en angiospermas es claramente especie-específica (Nagl, 1982). Estos hallazgos nos alientan para la búsqueda de características estructurales en el organelo principal de las células eucarióticas -el núcleo-, posiblemente derivadas de cambios evolutivos; por este motivo se ha seleccionado la investigación relacionada con la búsqueda de diferencias ultraestructurales del núcleo interfásico en células vegetales.

Podemos decir que se han hecho grandes aportaciones para comprender los mecanismos de la evolución y la reconstrucción de relaciones filogenéticas. Se ha demostrado, por ejemplo, que el estudio de la variabilidad del ADN permite detectar las huellas de la selección de los genes en las generaciones anteriores (Begun y Aquado, 1992); No obstante, a más de 130 años de la propuesta de Darwin y más de 50 años del neodarwinismo, aún existen importantes vacíos en las teorías sobre aspectos de la evolución orgánica (Lenski y Mittler, 1993; Aguilera, 1993).

I. MARCO TEÓRICO

A. Evolución vegetal

1. Origen de la vida

El origen de los vegetales es, muy probablemente, común al origen de todos los organismos que actualmente poblamos el planeta (en Alberts y col., 1989). Al respecto, en 1921 Oparin y Haldane propusieron, por primera vez, una teoría científica que abrió las puertas a la experimentación para explicar los posibles mecanismos relacionados con los procesos de transformación de la materia inerte a la viva. En 1952, Stanley Miller sometió a descarga eléctrica los supuestos componentes de la atmósfera primitiva (CH_4 , NH_3 , H_2 y H_2O) y obtuvo una serie de aminoácidos, componentes esenciales de las actuales seres vivos (Miller, 1953). Esto fortaleció la idea de Oparin de que la materia inorgánica evolucionó hacia la materia orgánica y luego a la materia viva.

Aunque al parecer las condiciones del experimento de Miller no fueron realmente las que propiciaron en la tierra el origen de la materia orgánica (Schlesiger y Miller, 1983), se sabe que ese tipo de moléculas se forman con relativa facilidad en distintas partes del universo. Considerando que la tierra desde su origen ha recibido constantemente meteoritos, es posible que la fuente de materia orgánica proviniera del exterior del planeta. Así lo sugieren los análisis de meteoritos en los que se ha demostrado un contenido de aminoácidos semejantes a los obtenidos por Miller (Chyba y Sagan, 1992).

El período que va desde el origen de la tierra (hace unos 4 600 millones de años), hasta las evidencias de actividad orgánica, es relativamente corto. De acuerdo con los signos de vida microbiana (reacciones de fotosíntesis) encontradas en sedimento de material orgánico fechado

con una antigüedad de 3 800 millones de años (Schidlowski, 1988), los primeros organismos aparecieron, a lo sumo, 800 millones de años después de la formación de nuestro planeta. Lo sucedido en ese período es en gran medida desconocido a pesar de la relativa facilidad con que aparentemente se llevó a cabo.

Se ha supuesto que la materia orgánica se acumuló formando una sopa primitiva. También se ha planteado la posibilidad de la formación de proteínoides (en Lazcano-Araujo, 1989). Se ha sugerido una evolución química sobre una superficie mineral más que en una solución acuosa (Wachterhauser, 1988). Pero hasta hoy, las diferentes propuestas no tienen una estructura que tome en cuenta una explicación integral de las evidencias que han acumulado las distintas disciplinas involucradas en este tema. Aun así, las tendencias actuales consideran que el ARN pudo jugar un papel central en este proceso (Gilbert, 1986).

A finales de los setentas los biólogos descubrieron que los genes de los eucariontes se copian, la mayoría de las veces, en una molécula de ARN más larga de lo aparentemente necesario. Las porciones excedentes, llamadas intrones, sufren una escisión de la hebra de ARN y los fragmentos restantes, o exones, se unen en un proceso llamado "splicing" o empalme.

En los fragmentos del ARN correspondiente a los intrones, se han encontrado propiedades autocatalíticas siendo necesaria la presencia de magnesio y guanosina para realizarse *in vitro* el proceso de escisión y empalme (Cech y col, 1981). Este descubrimiento abrió las posibilidades de considerar que las primeras reacciones enzimáticas pudieran ser efectuadas por el ARN sin requerir de las proteínas como catalizadores.

Las posibilidades del papel del ARN sobre el origen de la vida se han ampliado con el descubrimiento de las propiedades autocatalíticas de esta molécula y de la capacidad de los intrones de actuar sobre otras moléculas de ARN, sin quedar a su vez modificada (Zaug, 1986).

Otro enfoque permite identificar nuevas actividades catalíticas del ARN. Consiste en imitar el proceso natural de evolución, seleccionando *in vitro* algunos ARN entre un gran número de

fragmentos fabricados al azar. De la población heterogénea sólo se seleccionan las hebras que se unen a un sustrato determinado. Para ello, se hacen pasar las hebras por una columna en la que se ha fijado la molécula blanco. Los ARN que reconocen a la molécula blanco se retienen, pero su número es extremadamente escaso. Es ahí donde interviene una técnica reciente y muy potente de amplificación de material genético, la PCR (de polymerase chain reaction). Los ARN se convierten en ADN y se amplían varios millones de veces bajo la acción de una enzima termoestable, la Taq polimerasa. Luego se convierten de nuevo en ARN y se aplican a la columna. El ciclo se va repitiendo hasta la selección de una población homogénea de ARN; entonces, estas moléculas pueden probarse para buscar una eventual actividad catalítica sobre el sustrato (en Gerlach y Robaglia, 1993).

El estudio del comportamiento de biomoléculas en condiciones de la tierra primitiva seguramente dará más luz sobre el origen de la vida; pero en la actualidad, gran parte de los conocimientos sobre los procesos evolutivos se han obtenido del estudio de restos fósiles.

En Isua, Groenlandia, se han encontrado las microestructuras orgánicas más antiguas, las cuales tienen una edad de 3679 ± 70 millones de años, no son verdaderos fósiles celulares sino organizaciones moleculares del tipo de complejos como los coacervados de Oparin y las microesferas de Fox (Schoft, 1978).

Los organismos con actividad fotosintética se encuentran entre los fósiles más antiguos. Existen estructuras formadas por la acumulación de un fino sedimento, generalmente carbonato de calcio, atrapadas por comunidades microbianas fotosintéticas: los estromatolitos. En sedimentos de estromatolitos silificados² se han descubierto los fósiles con una edad entre 3100 y 2700 millones de años. Éstos son procariontes sin movimiento que corresponden a bacterias, principalmente a pre-cianobacterias (Schopf, 1978). Fósiles más antiguos se han descubierto recientemente (Schopf y Paker, 1987) con una antigüedad de 3.3 a 3.5 mil millones de años en

²En los sedimentos de estromatolitos el carbonato de calcio, el cual es poroso, no preserva los organismos, mientras que el silicio algunas veces lo hace.

EVOLUCION VEGETAL

(EN EL PRECÁMBRICO)

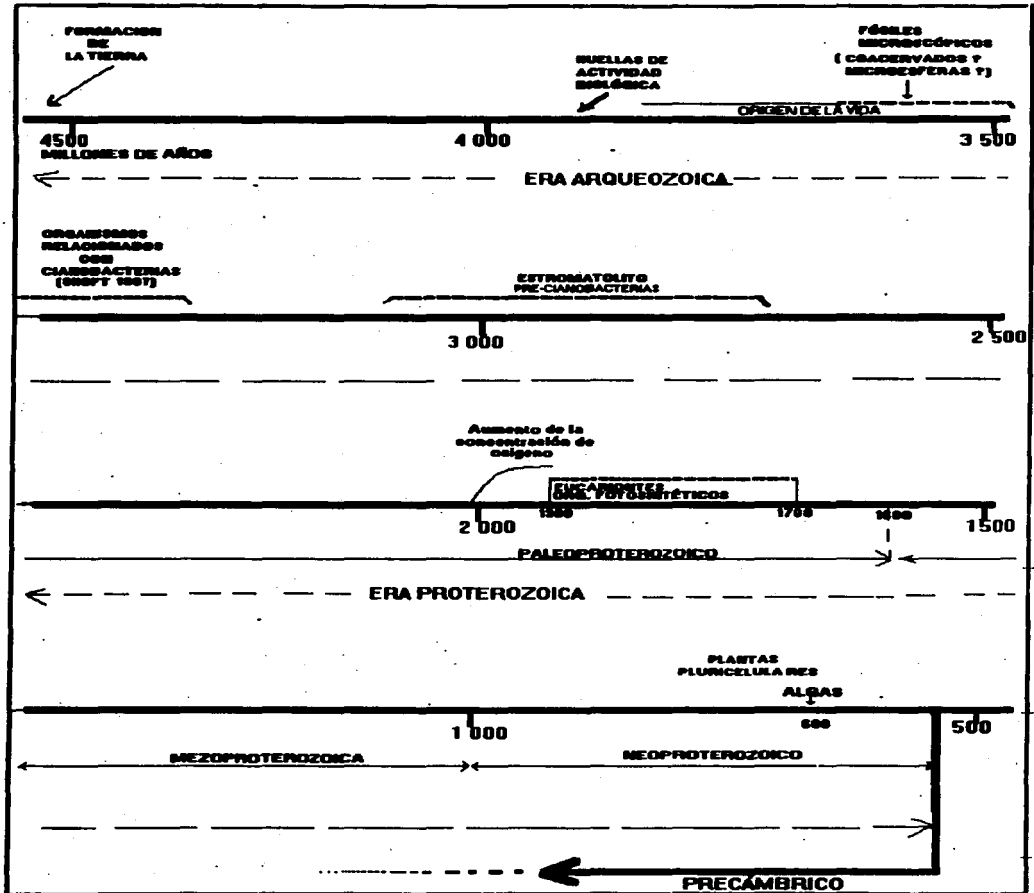


FIG. 1A. Eventos más significativos en la evolución de los organismos en el Precámbrico

EVOLUCION VEGETAL

hace de 400 a 200 millones de años

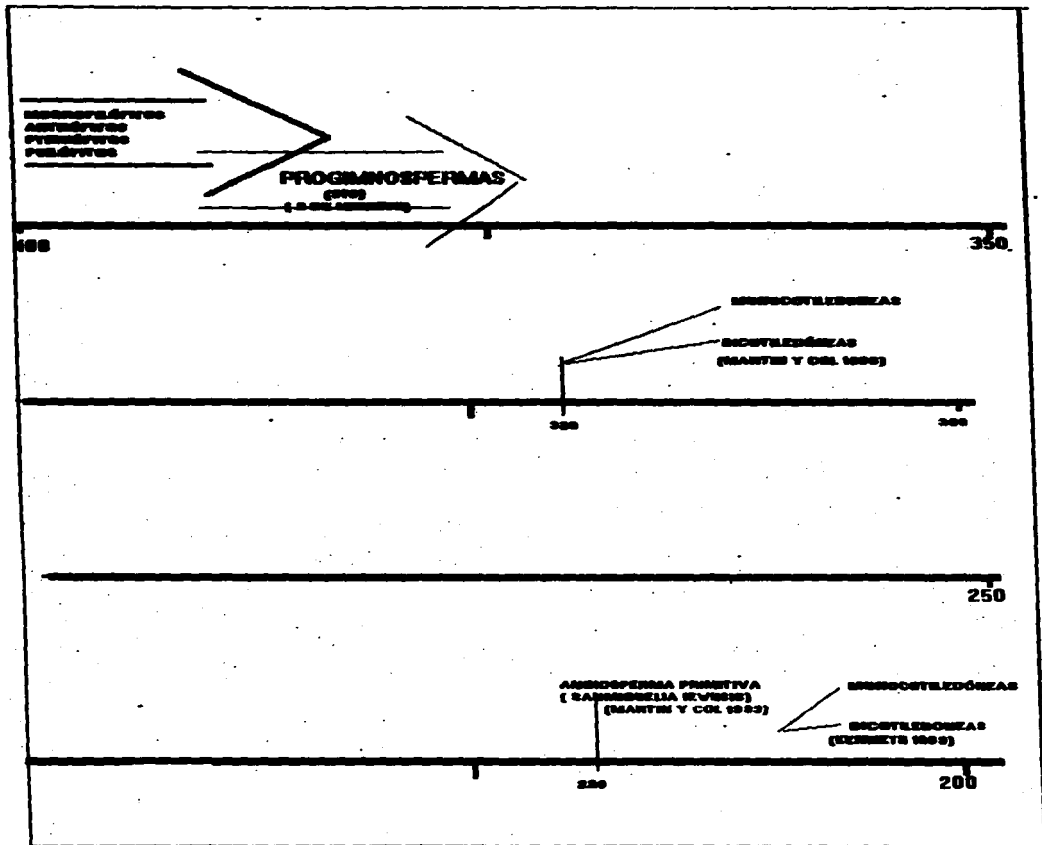


FIG 1B. Eventos más significativos de la evolución vegetal en los últimos 400 mil años

el noreste de Wester Australia. Estos fósiles también sugieren ser organismos relacionados con las cianobacterias.

Los fósiles indican que los primeros organismos fueron procariontes y que los eucariontes aparecieron después de 2 000 millones de años de evolución procariontíca. La diversidad durante ese período fue escasa, pero a partir del origen de los organismos nucleados, comprendido entre 1700 a 1900 millones de años de antigüedad (en Jiménez-García y Segura-Valdez, 1992), la diversidad de los seres vivos se incrementó hasta originar las especies que actualmente existen. En la figura número 1A se esquematizan los hechos más significativos de la evolución vegetal en el Precámbrico.

2. Origen de los eucariontes

Los eucariontes son de mayor tamaño que los procariontes (10-100 μ); en su sistema genético, el ADN se encuentra asociado con proteínas en los cromosomas y es repetitivo, el núcleo está delimitado por membrana; contienen organelos de distinto tipo como son las mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, Golgi, etcétera; en muchos organismos existen tejidos; sus formas de división celular están asociadas con la mitosis; en su sistema sexual existe una fusión nuclear completa de genomas gaméticos equivalentes, asociados con la meiosis; cuando están presentes los cilios o flagelos, son complejos. Estas son las principales características que diferencian a los eucariontes de los procariontes. Estos últimos son generalmente más pequeños (1-5 μ), su sistema genético, el ADN, no se asocia con histonas, su nucleóide no está delimitado por membranas, tiene poco o nada de ADN repetitivo; no posee membranas internas; no forman tejido; en su sistema sexual, cuando está presente, la transferencia de genes es unidireccional desde el donador al receptor; cuando existen flagelos son simples (en Karp, 1987).

Como se puede apreciar, los eucariontes poseen una organización mucho más compleja que los procariontes; esto explica la diferencia tan grande entre el origen de los procariontes (menos de 800 millones de años después del origen de la tierra) y la aparición de los eucariontes (alrededor de 2 600 millones de años después del origen de la tierra). El surgimiento de los eucariontes es un hecho muy importante en la evolución de los seres vivos y existe el consenso

de que estos organismos se originaron de los procariontes más primitivos (Schwemmler, 1984).

En la actualidad hay dos hipótesis con más aceptación para explicar el origen de los eucariontes. La hipótesis de compartimentalización (Bogard, 1975; Cavalier-Smith, 1975) y la hipótesis de la endosimbiosis (Margulis, 1971).

De acuerdo con la hipótesis endosimbiótica, las células animales se desarrollaron antes que las plantas. Esto fue logrado por un procarionte anaeróbico heterotrófico que obtenía su energía a través de una vía glucolítica con capacidad de incorporar sustancias en forma de partículas, de esta manera integró bacterias flageladas, después bacterias respiratorias, y finalmente algas azul-verdes (Cianofitas), estableciendo entre ellas relaciones simbióticas. En una reconstrucción de la evolución celular, Schwemmler (1984) presentó un modelo hipotético (ver figura 2) del desarrollo de los más importantes tipos de eucitos o ancestros de las plantas, hongos y animales que evolucionaron hasta originar los actuales seres vivos.

Una hipótesis alternativa a la endosimbiosis es la hipótesis de la compartimentalización (fig. 2), la cual propone que los eucariontes se desarrollaron en línea directa de un procarionte. Esta hipótesis supone que una cianofítica facultativa fototrófica que perdió la pared celular se compartimentizó como resultado de la fagocitosis. La especialización de los compartimientos proporcionó a esas células ventajas selectivas.

Cabe aquí la observación que dentro de los procariontes se ha reconocido otro gran grupo, las archaeobacterias (Woose, 1981). Las archaeobacterias, que comprende a los grupos de las Methanobacterias, Halobacterias y Sulfobacterias, se les agrupan dentro de los archoa para diferenciarlos del resto de procariontes denominados eubacterias.

Del análisis de secuencias del ARNr 5S de algunos organismos (Hori H. y col., 1985), se deduce que las eubacterias se separaron de la rama metabacteria/eucariontes. En la rama eubacterial, las cianobacterias (más cloroplastos) emergieron primero y esto fue seguido por la diversificación del árbol del grupo bacterial mayor: bacterias Gram-negativos, Gram-positivo,

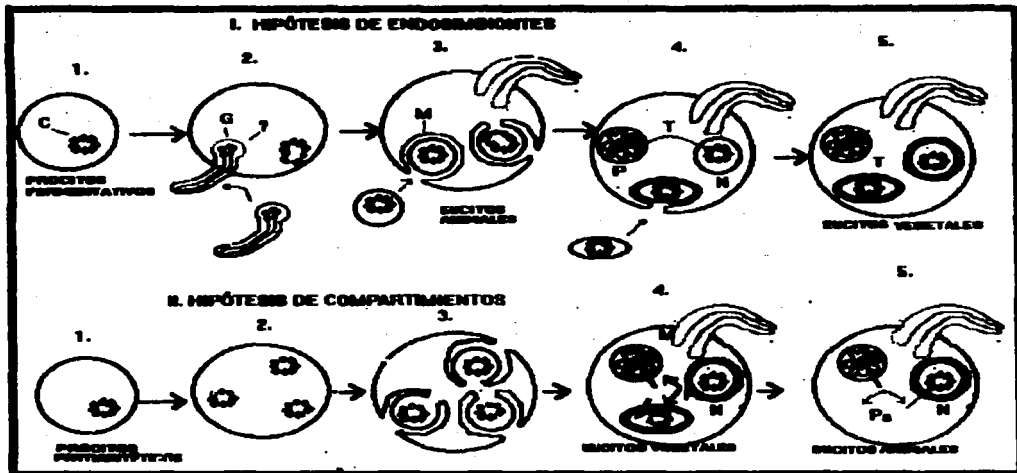


Fig. 2

Representación simplificada de las hipótesis alternativas sobre la evolución de los eucitos.

Tomado de Schramm W. 1984. Reconstruction of Cell Evolution: a periodic System CRC. Press. Inc. EUA. p135.

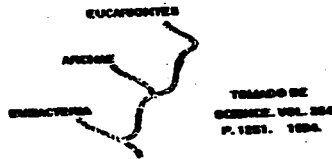
I. De acuerdo con la hipótesis endosimbiótica, las células se desarrollan por integración de algunos procritos: 1. Procito fermentativo como huésped con membrana asociada al cromosoma (C); 2. Incorporación de un simbionte flagelar (G), cuyo ADN fue enteramente o en parte integrado dentro del cromosoma huésped; 3. Integración de una bacteria aeróbica como mitocondria (M); formación de un eucito animal por subsecuente invaginación de membrana para formar un núcleo (N); 4. Integración de una alga azulverde como cloroplasto (P); transferencia de gene (T) entre el núcleo y la mitocondria, formación de un eucito vegetal.

II. De acuerdo a la hipótesis de compartimentalización, el eucito se origina de un procito por diferenciación intracelular o compartimentalización; 1. Procito fotosintético como forma inicial; 2. Duplicación del genoma del procito; 3. Invaginación de la membrana celular con sus enzimas respiratorias y fotosintéticas para formar una doble membrana alrededor del núcleo (N), las mitocondrias (M) y el cloroplasto (P); 4. La biosíntesis de proteínas (Pi) dependiendo de las mitocondrias (M), plástido y núcleo; diferenciación de la pared celular y el flagelo, formando el eucito vegetal; 5. Desarrollo del eucito animal por pérdida de plástido y pared celular

y el tipo intermedio de bacterias tales como *Micrococcus* y *Streptomyces*. Después de emerger las bacterias, las metabacterias (*Halobacterium*, *Thermoplasma*, *Sulfolobus*, *Metágenos*, etcétera.) y los eucariontes se separaron de su ancestro común. Las metabacterias están fisiológicamente más cercanas a los eucariontes que a las bacterias.

En concordancia con lo anterior, recientemente se ha propuesto que las sulfobacterias están más relacionadas con los eucariontes que con el resto de las archaeobacterias y que las Halobacterias están más cercanas a las eubacterias que a otras Archaeobacterias por lo que se ha propuesto que las sulfobacterias actuales a las que llaman eocitos, comparten un ancestro común con los eucariontes; por esta razón se ha propuesto un tercer grupo dentro de los procariontes: los eocitos (Lake 1990 en Jiménez-García y Segura Valdez, 1992). No obstante, el estudio de los mecanismos de transcripción de las archaeobacterias sugieren una mayor cercanía con los eucariontes (Rowlands y col., 1994).

Es ampliamente conocida la diferencia de los mecanismos de transcripción en eubacterias y eucariontes (ver más adelante pags. 45-54), pero en los Archoa los estudios en este aspecto se han iniciado muy recientemente; no obstante, se ha encontrado similitud en las primeras etapas del proceso de transcripción del gen a ARN entre eucariontes y archoas. La similitud consiste en que la proteína unidora del TATA (TBP) funciona como un factor de transcripción tanto en eucariontes como en archaeobacterias. Esto sugiere que en las TBP's, la forma de la transcripción se estableció antes de la divergencia entre archaeobacterias y eucariontes, por lo que se ha propuesto un gran árbol de los seres vivos en donde se establece un origen común entre eubacterias y el ancestro común del grupo archoa y eucariontes (Bainarya M., 1994).



El progreso en las técnicas de secuenciación de macromoléculas como proteínas, ARN y ADN, ha permitido que recientemente se pueda evaluar la relación entre los organismos vivos. El cálculo computarizado de datos sobre la secuenciación sirve para la construcción de árboles filogenéticos o coeficientes de asociación para proteínas comparables o especies de ácidos nucleicos de diferentes organismos. Los puntos de divergencia reflejan distancias filogenéticas relativas entre dos organismos en comparación.

La comparación de ARNs de transferencia isoceptores de cloroplastos entre algunas plantas superiores ha demostrado que su secuencia de nucleótidos es casi idéntica. De igual manera se ha encontrado una gran homología (65-85%) entre la secuencia de los ARNs de transferencia isoceptores de los cloroplastos de plantas superiores y la secuencia que presentan los procariontes (eubacterias y cianobacterias) pero no así entre las respectivas especies de los ARNt citosólicos de las células vegetales y los cloroplastos de la misma célula (Wose, 1981; Schwemmler, 1994). Esto sugiere una línea filogenética directa entre bacterias azul verdes y cloroplastos, tal como lo propone la hipótesis de la endosimbiosis.

La teoría endosimbiótica se apoya aún más en la comparación de secuencias de nucleótidos de ARNr 5S de cloroplastos, los cuales han resultado ser muy similares al ARNr 5S de *Anacystis nidulans* (Dyer y Bowman, 1979). Los mismos resultados se han obtenido con la secuenciación del gen de ARNr 16S de *Anacystis nidulans* que es casi idéntica al gen de ARNr 16S de los cloroplastos (Tomioaka y Sugira, 1983). Por otra parte, al menos tres genomas de plástidos han sido secuenciados completamente (de arroz, tabaco y hepática), no dejando duda de que los ancestros de esos organelos son cianobacterias (en Margulis, 1993).

3. Análisis de secuencias en ADN, ARN y proteínas.

Se ha mencionado el recurso de la secuenciación de biomoléculas y su comparación para complementar las evidencias que apoyan las hipótesis sobre aspectos de relaciones filogenéticas. A continuación se describirán los principales métodos utilizados en los últimos años para este

propósito.

Existen tres clases principales de algoritmos para construir árboles filogenéticos: el método de matriz de distancia, método de parsimonia, y método MLE (Clegg, 1993). El primer método usa matriz de distancia en pares (usualmente corregido para sustituciones múltiples en un sitio) para agrupar taxa con la menor distancia. La matriz es entonces reducida a un renglón y una columna. Se calcula una nueva matriz de distancias pareadas y se lleva a cabo una segunda ronda de agrupamiento. Este proceso se reitera hasta quedar un solo par.

El método de parsimonia³ se basa en el principio de construir las relaciones entre ADN en forma de un árbol. Se comparan varios tipos de ADN explicando el paso de un nivel a otro por mutaciones o "pasos" sucesivos. Se considera como relación más cercana aquella que necesita menos pasos.

El método de parsimonia intenta encontrar el o los árboles que minimizan el número de cambios de estado mínimo (sustitución de nucleótidos) para un conjunto dado de datos. En el método de parsimonia no intenta corregir para sustituciones múltiples en un sitio, ello puede ser parcial cuando taxa distantes son incluidos en un análisis, y es bien conocido que el método de parsimonia puede ser parcial por variaciones en taxas. En principio, todo posible árbol podría ser evaluado por el número de cambio de estado de caracteres requerido para el conjunto de datos. El árbol (o árboles) con el mínimo número de pasos (cambio del estado de caracteres), es entonces seleccionado como la(s) solución(es) parsimónicas. Frecuentemente más de uno satisface los criterios de parsimonia. En realidad, el número de posibles árboles es usualmente demasiado grande para permitir una exhaustiva evaluación [por ejemplo, hay $> 10^{30}$ posibles raíces para un árbol de bifurcaciones para 25 secuencias (taxa). Como consecuencia, varios métodos heurísticos lo están usando para cada subconjunto de posibles árboles.

³Se considera que las mutaciones son acontecimientos raros y que, por tanto, la naturaleza de éstas es parsimoniosa.

El método MLE está basado sobre principios estadísticos bien definidos, lo que permite que se conozcan algunas propiedades de las propuestas hechas mediante este procedimiento. Entre las más importantes de esas propiedades está la normalidad asintótica, la cual permite el uso de pruebas de probabilidad para evaluar el modelo asumido. El método MLE está basado sobre un modelo probabilístico de los procesos de mutaciones y ello permite variación en tasas de sustitución entre diferentes ramas del árbol. En común con el método de parsimonia, el método MLE requiere el cálculo de un valor de probabilidad para cada árbol. El mejor árbol, es el árbol con el puntaje MLE global tomado sobre el conjunto de todas las posibilidades del árbol. El algoritmo de probabilidad debe usar métodos heurísticos para bucar un subconjunto de todos los posibles árboles y por lo tanto es útil para presentación local más que para soluciones globales. De nuevo, es necesario buscar varios conjuntos no disjuntos de árboles para intentar encontrar el mejor.

Hay algunas fuentes de error asociados con la estimación de filogenia. El primer origen surge de la llegada al azar de la sustitución de nucleótidos en cualquier linaje particular. Este error estocástico puede ser evaluado a través de modelos probabilísticos de los procesos de mutaciones o a través de la aplicación de muestras (Felsenstein, 1985). El método MLE proporciona una estimación directa de la varianza de la longitud de las ramas de los árboles filogenéticos y así proporciona una significancia para pruebas entre árboles (Kishino y Hasegawa, 1989). Otra fuente de error se origina de la incertidumbre en los métodos de análisis del ADN del organismo fuente

Para obtener las distancias evolutivas en términos del número de nucleótidos sustituidos, se comparan los sitios homólogos, es decir, sitios ocupados por diferentes bases de nucleótidos; si ambas son purinas o ambas son pirimidinas, la diferencia es llamada tipo I o tipo transicional. Cuando una es purina y la otra es pirimidina, la diferencia es llamada tipo II o transversional.

La distancia evolutiva, K_{nuc} y el error estándar de K_{nuc} , $\sigma_{K_{nuc}}$, entre dos secuencias comparadas se calcula por la ecuación $K_{nuc} = -(1/2) \log[(1-2P-Q)(1-2Q)^{1/2}]$, donde P y Q son la fracción de sitios de nucleótidos que exhiben diferencias de tipo transicional y transversional

respectivamente (Kimura 1980). Esta manera de calcular distancias evolutivas se ha utilizado para deducir filogenia de distintos grupos (Hori y col., 1985; Lim B-L, 1986). También con este método Hori y colaboradores, en 1985, propusieron un árbol filogenético para las plantas. En las figuras 3 y 4 se presentan árboles filogenéticos de las plantas propuestos por Hori y col. (1985), obtenidos a partir de esta metodología.

4. Primeras plantas

Si efectuamos una reconstrucción tomando como base los datos geológicos, paleontológicos, bioquímicos etcétera, se puede suponer que la evolución de los primeros vegetales se efectuó de la manera que se describe a continuación:

Durante un período relativamente largo, los protistas eucariontes no fotosintéticos prevalecieron en la tierra provocando una carencia de las sustancias orgánicas disponibles; luego, en el Precámbrico Tardío se produce una radiación de plantas y animales (Vossbrich y col., 1987).

Las primeras plantas, muy probables ancestros de las algas, aparecieron hace 600 millones de años. Su origen parece ser el resultado de una simbiosis entre eucariontes ancestrales y cianobacterias; de esta manera, las cianobacterias dieron origen a los cloroplastos, transformando a los eucariontes ancestrales heterótrofos en organismos autótrofos (Margulis, 1993). Esta teoría se apoya en el hecho de que los cloroplastos se desarrollan de protoplastidos o cloroplastos preexistentes; poseen su propio ADN, ARNm y su sistema de síntesis de proteínas; las proteínas de los plástidos son sintetizadas sobre pequeños ribosomas sensibles a antibióticos que afectan el desarrollo de procariontes; y los pigmentos de los cloroplastos (clorofila y carotenoides) son similares a los encontrados en las cianobacterias.

Mediante distintos métodos de estudio se han tratado de encontrar las relaciones filogenéticas entre las algas. En los trabajos hechos para definir las líneas evolutivas se han utilizado: los tipos de pigmentos, sustancias de reserva, composición química de las paredes celulares, dotación flagelar, tipo de cloroplastos, estructura de las crestas mitocondriales, propiedades antigénicas de la tubulina flagelar, entre otros (en Scigel 1984). Los resultados coinciden con estudios de

secuenciación de ARNr citoplasmático 28S que sugieren que las rodofitas, cromofitas y clorofitas surgieron como tres distintos grupos entre eucariontes, probablemente por eventos simbióticos independientes (Peraraso P. y col., 1989).

Con base en algunas características bioquímicas, dotación flagelar y tipos de cloroplastos; se ha propuesto la probable existencia de tres grandes líneas evolutivas en las algas (en Scagel, 1984).

En una de las líneas evolutivas de las algas se sitúa a las cianofitas y rodofitas las cuales poseen pigmentos ficobilínicos propios, presentan conexiones protoplasmáticas entre las células de algunos de sus representantes, los tilacoides de sus plástidos son simples, el α caroteno está más concentrado que el β caroteno (en Bold y col., 1989); sin embargo, es conveniente mencionar que los estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que las cianofitas son organismos afines a las bacterias (Stainer y Cohen-Baziere, 1977) por lo que podríamos considerar que esta línea evolutiva quedaría representada exclusivamente por las rodofitas.

El segundo grupo se caracteriza por poseer clorofila a y algún tipo de clorofila c; mitocondrias tubulares; y el uso de β -1,3 (o -1,6) poliglucano como producto de almacenamiento (en Bhattacharya, 1992). Este grupo está representado por las cromofitas (Bacillariophyceae, Crysiophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Pedinellophyceae, Phaeophyceae, Prymnesiophyceae, Raphidophyceae, Synurophyceae y Xanthophyceae).

En el tercer grupo están las algas que poseen clorofila a y b con la probable excepción de las xantofíceas, que posiblemente se derivan de la línea feofíceo-crisofíceo ya que almacenan crisolaminaria. Al tercer grupo de algas pertenecen las cloromonadofíceas, euglenofíceas, carofíceas y clorofíceas.

Las rodofitas, clorofitas y euglenofitas son las únicas que poseen un sistema completo para la producción de caroteno y luteína. En las rodofitas y en la línea clorofita-metafita, los cloroplastos están siempre encerrados por una doble membrana. Por otra parte, los euglénidos exhiben el ciclo de la diatoxantina-diadinoxantina, un ciclo presente en dianofitas y la mayoría

de las otras algas que producen clorofila C2, pero que no se encuentra en rodofitas y clorofitas (Jordan, 1980). Estas observaciones y otros indicios (Chang y col., 1981) sugieren que las euglenofitas se encuentran en ramas de eucariontes separadas. Las euglenofitas, pudieron originarse de éstas por transferencia de cloroplastos capaces de producir clorofila a y b a protozoarios euglenoides holozoicos mediante simbiosis (Gibbs, 1978; Kenneth y col., 1975) lo que podría explicar la similitud de sus cloroplastos con los cloroplastos de las clorofitas y la diferencia entre estos dos grupos en cuanto a su morfología celular. Podría ser también ésta la explicación de la presencia de una tercera membrana en los cloroplastos de las euglenofitas.

Las euglenofitas, dinofitas, criptofitas, crisofitas y algas relacionadas, podrían representar ramas de un tronco monofilético de organismos caracterizados por el mastigonema (Mc Quade, 1983; Hibbad 1979; Cavalier-Smith, 1981). Esto se explica con: a) la posibilidad de un reemplazamiento de clorofila b por clorofila C2 (Moyné, 1975); b) La aparición más de una vez, de la clorofila b; c) La improbabilidad de que la ruta metabólica para la síntesis de clorofila C2, que es muy compleja, haya evolucionado más de una vez (Corliss, 1984).

La ocurrencia de biliprotefnas en las rodofitas y criptofitas es explicada por Scagel (1980) como una aparición independiente; sin embargo, la llegada de clorofila secundaria permitió la desaparición de la producción de biliprotefnas (Anderson, 1981), aunque en las criptofitas puede haberse conservado (Mc Quade, 1983).

En lo que se refiere a la tercera línea evolutiva se puede decir que, aunque todas ellas poseen clorofila a y b, son divergentes. Esto se deduce a partir de sus características morfológicas y, en el caso de las Euglenofitas, se separan por su organización celular y por el hecho de poseer paramilo, frente a los otros grupos que almacenan almidón (en Bold y col., 1989).

El análisis de los resultados de la secuenciación de ARNr 5S de algunas algas y otros organismos (véase figuras 4 y 5) revela que en los principios de la evolución eucariótica, primero se originaron las algas rojas y fueron seguidas por los hongos (Basidiomycetes y Ascomycetes). Las plantas verdes, las algas café y los Protozoa/Oomycetes emergieron casi al

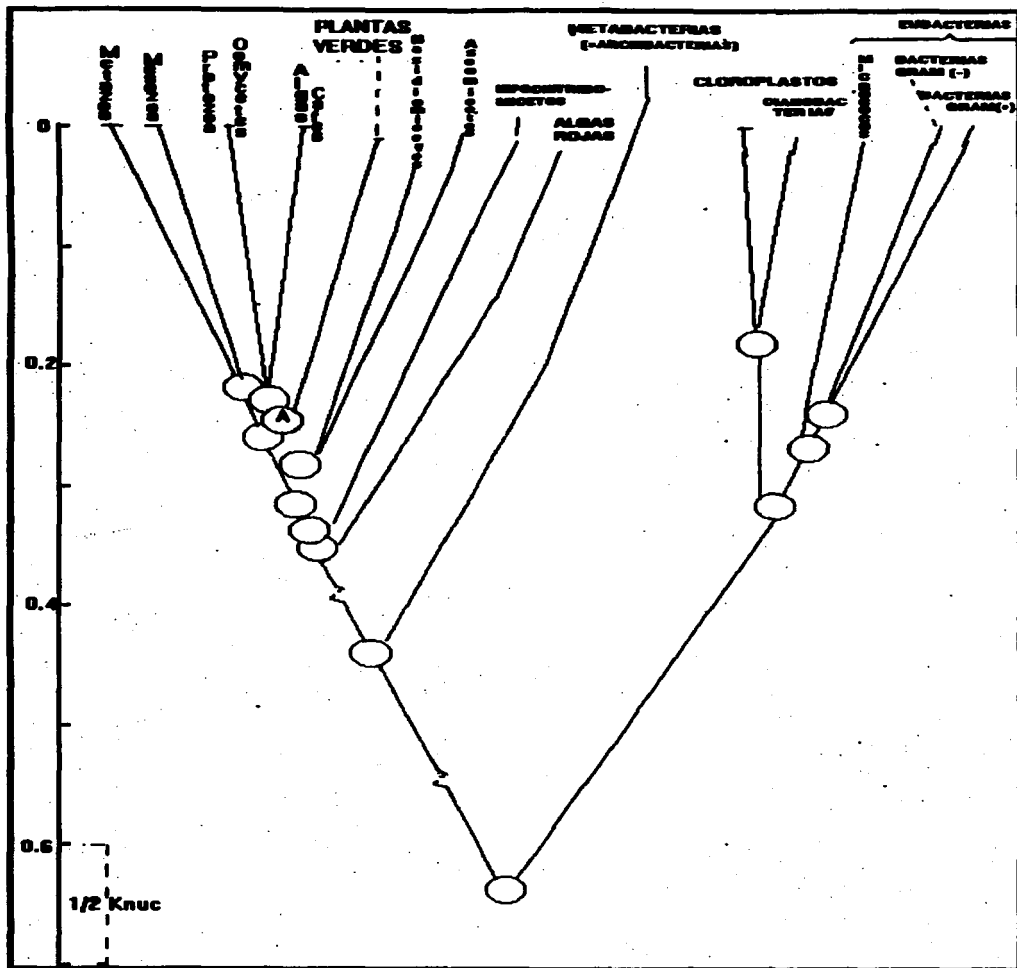


FIG.4. Árbol filogenético simplificado construido en base a el análisis de secuencias de ARNr 5S. Tomado de Hori y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985).

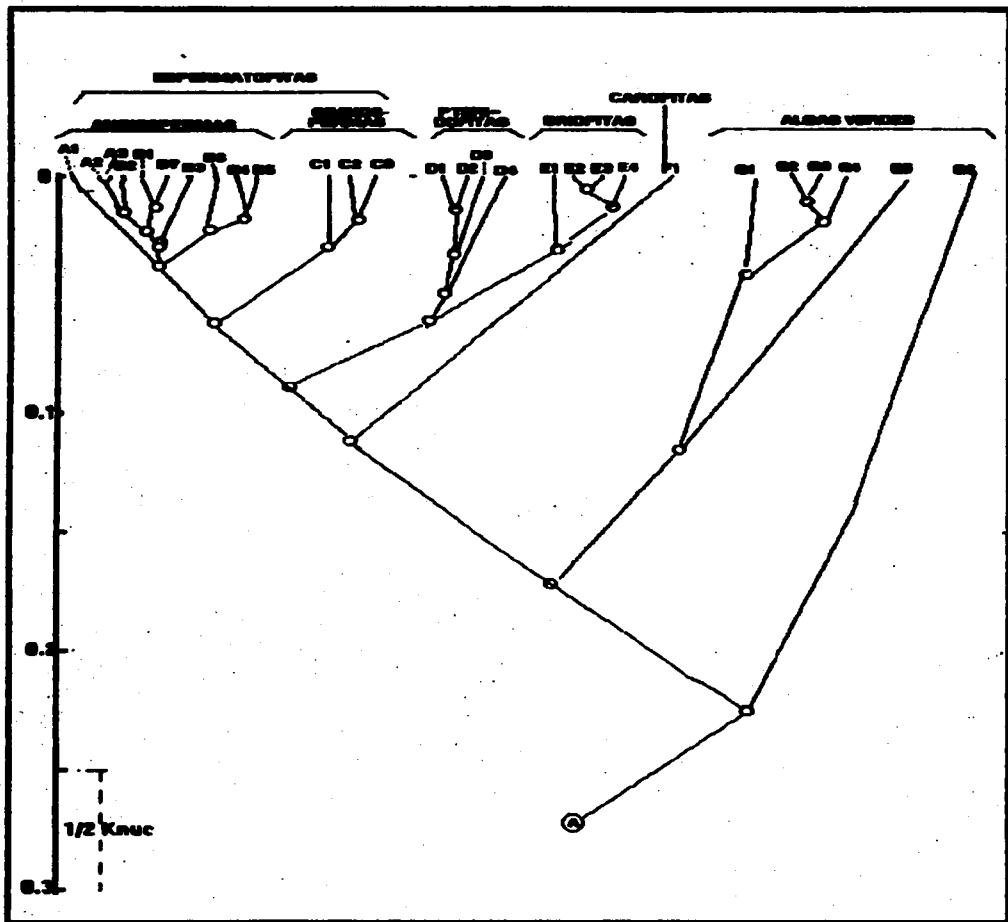


FIG. 5. Árbol filogenético construido a partir del análisis de la secuenciación del ARNr 5S. Tomado de Heri y col. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985).

mismo tiempo, pero probablemente haya sido uno por uno, en el orden mencionado. Posteriormente surgieron consecutivamente los organismos del grupo Mesozoa y Metazoa. Así, las algas rojas parece que emergieron primero de entre los grupos de los eucariontes y posteriormente las algas verdes, las cuales claramente pertenecen a la rama de las plantas verdes, no así las algas rojas (Hori y col., 1985).

5. Origen de las plantas terrestres

De acuerdo a los restos fósiles, la vida vegetal en el Cámbrico, Ordovísico y Silúrico, parece que fue principalmente acuática y consistía en algas de las formas sencillas del precámbrico cuya forma se asemejaba a las actuales algas verdeazuladas, verdes, rojas y pardas. Es probable que la mayoría de las grandes divisiones de algas hayan surgido en el mar mucho antes de que hubiera vegetación en la tierra, se volvieron tan especializadas como lo son hoy, por lo que no es probable que las plantas terrestres surgieran de formas tan evolucionadas. Por otra parte, las algas verdes eran y siguen siendo más primitivas por su estructura y sus formas de reproducción. Presentan una mayor plasticidad en su adaptación a diversos medios, lo que es un factor importante en la evolución de las plantas (en Wilson y Loomas, 1992).

Entre los principales argumentos que apoyan la propuesta de que las algas verdes dieron origen a las plantas terrestres, está la similitud que hay entre algas y embriofitas en cuanto a la proporción de clorofila a y b, y pigmentos carotenoides, que es aproximadamente igual, el almidón es el principal producto de reserva; y el componente principal de la pared celular es celulosa (en Scagel 1984, Bold y col., 1989).

En la mayoría de las clorofíceas, la citogénesis es efectuada por un sistema de microtúbulos del fragmoplasto, carecen de la enzima glicolato oxidasa y las células móviles representan un sistema undulipodia asociado con cuatro inserciones microtubulares en forma de cruz, insertado en la región anterior (Stewart y Matfox, 1975). Estas características ponen en duda que las clorofíceas hayan originado a las plantas superiores ya que la glicolato oxidasa parece ser universal en plantas terrestres (Nash, 1975) y sólo se presenta en taxas de carofíceas. También en algunas carofíceas la citocinesis es efectuada por un fragmoplasto que prolifera a partir de

un huso interzonal persistente y las células móviles tienen los undulipodias insertados lateralmente y asociados con sólo una banda de microtúbulos adyacentes.

Existen evidencias fósiles de vegetales similares morfológica y ecológicamente a *Coleochaete*, (género actual de clorofita) que existieron cuando las primeras plantas terrestres aparecieron y se diversificaron. Estudios efectuados mediante microscopía de luz y electrónica de algunas especies del género de *Coleochaete* sugieren una ruta posible para el desarrollo evolutivo del parénquima de plantas terrestres a partir de clorofíceas filamentosas y ramificadas del tipo de *C. solua* (Kivic, 1983).

Algunos autores consideran a la línea tetrasporina de las clorofíceas como la vía a las plantas superiores. Se cree que un organismo unicelular con dos undulipodia tipo *Chlamydomonas* sufrió una radiación evolutiva en tres líneas básicas. La línea volvocina, integrada por células coloniales que conservan la morfología de sus ancestros; la línea tetrasporina, que comprende organismos con estructura filamentosas, parenquimatosa y ramificada; y la línea sifonada, en donde las algas son cenocíticas. La línea volvocina, al igual que la sifonada, no originaron nuevos patrones estructurales. En cambio la tetrasporina que se inicia con una célula vegetativa inmóvil, pudo dar origen al tejido parenquimatoso y luego a tejidos más complejos en plantas superiores, mediante la evolución de las formas de división celular en uno, dos y tres planos. Si el tipo de célula que inició la línea se divide y las células procedentes de esta división continúan dividiéndose en el mismo plano, se origina un filamento uniseriado simple de células. Este tipo básico uniseriado produce ramificaciones si algunas células se dividen ocasionalmente en un segundo plano, pero si cada una de las células se divide una vez en un segundo plano se origina un talo biseriado y si además, las divisiones según un segundo plano se produce repetidamente se origina un talo foliáceo como el de ulva. Otras divisiones de ciertas células según un tercer plano producen un talo parcialmente parenquimatoso como en *Fritschiella*.

De nueva cuenta la secuenciación de los ácidos nucleicos ha ayudado a definir la idea evolutiva de las plantas. Utilizando la secuencia conocida del ARN 5S de 30 plantas de distintos niveles

de organización, se ha reconstruido un árbol filogenético de las algas verdes. El árbol muestra que todas las plantas verdes incluyendo plantas vasculares (Pteridopyta y Spermatophyta), las briofitas, y las algas verdes pertenecen a la rama derivada del extremo superior (véase fig 4). Sobre esta rama que emerge de las *Chlamydomonas* que surge a muy temprana edad, varias algas verdes después se separaran. Entre las algas verdes, *Ulva* se separa de *Spirogyra/Chlorella-Scenedesmus* antes de la diversificación de éstas últimas.

En general se ha aceptado que las plantas terrestres y las algas verdes tienen un ancestro común. Entre las algas verdes el precursor directo podría ser una Pteridofita semejante a *Nitella*. La comparación de ARNr 5S entre *Nitella* y plantas terrestres sugiere que las clorofitas surgieron justo antes que las clamidofitas y las pteridofitas/briofitas.

6. Primera plantas terrestres

El registro fósil indica que la vida se restringió al agua por un período de 2,500 millones de años. Al final de este período comenzó la colonización de la tierra. En la conquista de la superficie terrestre, las algas verdes debieron sufrir modificaciones que les permitiera la sobrevivencia. Desarrollaron raíces, tejido rígido de soporte, sistema de circulación para el agua y los nutrientes, células reproductoras capaces de ser transportadas por agentes distintos del agua, paredes gruesas y cutinizadas para evitar la desecación (Rost, 1979; en Bold y col., 1989). Los fósiles de las primeras plantas terrestres tienen una edad aproximada de 420 millones de años (en Li W. y col., 1989)

Previamente a la adquisición de tejido conductor, probablemente se haya dado la divergencia entre las briofitas y plantas vasculares. Se considera aquí dentro del grupo de las briofitas a las hepáticas, antoceros y musgos; las cuales son similares en su ciclo vital, siendo las plantas en cada caso un gametofito libre sobre el cual nace un esporofito que puede ser parcial o totalmente parásito. Pero se reconoce que las diferencias entre sí, son suficientemente significativas como para ser clasificadas como divisiones separadas (Bold y col., 1989).

En restos fósiles del Devónico Bajo encontrados en Escocia y Alemania se han encontrado plantas gametofíticas con estructura anatómica y fisiológica afines a un gametofito briofítico. También se han encontrado esporofitos de plantas vasculares con algunas características semejantes a las briofitas. Estos restos pueden indicar una estrecha relación entre briofitas y traqueofitas (Remy, 1982). Esto ha llevado a la propuesta de considerar un origen común para las plantas terrestres a partir de las algas verdes y una posterior diversificación a briofitas y traqueofitas.

Algunas de las interpretaciones respecto al curso de la evolución de la flora terrestre a partir de sus progenitores algales, han sido incorporadas en la teoría telomática de Walter Zimmerman (1976). Esta teoría intenta interpretar las plantas existentes en términos de sus orígenes a partir de sus precursores extinguidos.

De acuerdo con la teoría telomática el esporofito de los progenitores algales con ramificaciones dicotómicas estériles o fértiles llamadas telomas dieron origen a las estructuras de plantas terrestres mediante procesos de dominancia, planación, concrecencia lateral, curvatura y reducción.

En los restos fósiles de Gwynnevaughany, que datan del período Devónico, se puede apreciar epidermis y estela en plantas con un sistema horizontal de tallos y ramas que parecen penetrar en el suelo. Asimismo, en lechos de fósiles de 395 millones de años de antigüedad, se han descubierto plantas vasculares que permiten sugerir que las primeras plantas vasculares tenían un tallo delgado, ramificado en forma dicotómica, con o sin apéndices de hojas vivas y con esporangios, ya sea en las puntas de las ramas o a lo largo de sus lados (Rost, 1979; Banks, 1970).

Se han encontrado plantas fósiles que datan de fines del Silúrico y del Devónico, las cuales consisten en un eje desnudo y ramificado, carece de hojas y de raíces y la ramificación es dicotómica. Una parte de este sistema del tallo es horizontal y haces capilares servían para absorber agua y minerales del suelo (Satterthwart y Schopf, 1972). Las ramas aéreas se

extienden hacia arriba y algunos de los tallos terminan en pequeños sacos de esporas o esporangios (en Delevoryas, 1979; Wilson y Loomis 1992, Zimerman, 1976), estas plantas pertenecen al género de *Rhynia* que es una de las plantas más simples que existieron en los períodos Silúrico y Devónico.

El grupo de plantas actuales que se relacionan con el grupo rhinales es el orden de las psilotales; que comprende a *Psilotum* y *Tmesipteris*. *Psilotum* comparte características con psilofitos fósiles como la ramificación dicotómica, presencia de rizomas con rizoides, hojas verdaderas rudimentarias o ausentes, esporangios en posición terminal sobre ramas y disposición protostélica de los vasos en el tallo. Basándose en estas características comunes, se afirma que las psilotales son primitivas y están relacionadas con los psilofitos fósiles. Sin embargo, no se han encontrado fósiles de *Psilotum*, por lo que también se ha sugerido que *Psilotum* y *Tmesipteris* corresponden a reducciones evolutivas de otros grupos más complejos como Licopodios (Bold, 1989; Sckagel, 1984; Wilson y Lewis, 1992).

6. Pteridinospermas

Entre el grupo de rhinales se dieron ciertas tendencias evolutivas. Los primeros esporangios, en un principio solitarios y globosos, tendieron a una forma elipsoide y a formar racimos para fusionarse. Las plantas poco ramificadas aumentaron su ramificación. Del modelo primitivo de planta terrestre pudieron originarse tres tipos de estructuras: Plantas con hojas grandes con posición alterna, cuerpo leñoso con médula y haces medulares (eustele o poliestele), esporangios en hojas pinadas o en sus derivados, a este modelo pertenecen las pterophyitas. El segundo tipo de estructuras pertenece a plantas con hojas pequeñas y alternas, cuerpo leñoso con actinosteley y esporangios en posición epifilia como las lycophyitas. Finalmente, plantas con hojas pequeñas reticuladas, cuerpo leñoso con médula y haces medulares (eustela) como las equisetophyitas (Zimerman, 1976).

En los niveles más inferiores, las plantas son isospóricas y aún se encuentra ese carácter en los helechos primitivos (protopteridades), pero se conocen también prehelechos heterospóricos. Se

supone que una unidad de este tipo debe encontrarse en la línea evolutiva de las angiospermas pero la diferenciación de las esporas y macrosporas que está ligada a una reducción en la generación sexual, ha sido un proceso importante que se ha desarrollado paralelamente en los tres grupos principales. La innovación decisiva es la inamovilidad de las macrosporas dentro de los microsporángios lo cual da origen a los helechos con semilla. Las macrosporas ya no abandonan la envoltura del esporangio y realizan todo su desarrollo en el macrosporangio sobre el esporofito materno. El macroesporangio se convierte en semilla.

La evolución de la semilla fue la siguiente etapa, después de la colonización de la tierra por plantas vasculares, que da a la vida en la tierra las actuales características de las interacciones entre plantas y animales (Chaloner, 1989). Existe buena documentación de las estructuras relacionadas con las pre-gimnospermas, las cuales dan origen a las primeras gimnospermas. Hay un acuerdo general que de este antiguo grupo surgieron todas las plantas con semilla (gimnospermas y angiospermas).

Se supone que las microsporas germinaban y formaban gametofitos masculinos que, envueltos en la membrana de la espora, eran descargados del esporangio y diseminados por el viento y el agua, y la fecundación se realizaba en la planta progenitora. Los gametos masculinos eran en un principio móviles y llegaban al óvulo sólo cuando había agua de lluvia o rocío. Posteriormente se formó un tubo polínico y los espermatozoides se volvieron inmóviles. Sin embargo, en algunas plantas actuales con semillas, los gametos que hay dentro del tubo polínico conservan órganos de motilidad (Wilson y Loomis, 1992).

Las plantas heterosporicas del Devónico Tardío redujeron al mínimo las megaesporas en cada esporangio hasta culminar en una simple megaespora de larga sobrevivencia formando la estructura central de las primeras semillas (en Chaloner, 1989), a fines del Devónico/principios del Carbonífero. Por otra parte de la reproducción sexual, que involucraba espermias móviles capaces de nadar a través de la humedad del suelo para fertilizar la gameta femenina, se transformó. La gameta femenina se convirtió en una célula inmóvil y el proceso de fertilización fue internalizado. Esto dio a la planta gran independencia de la humedad en el medio ambiente

al efectuar la reproducción. El polen llevado por el viento quizá era atrapado por una gota de exudado húmedo (como en las actuales coníferas) y trasladado adentro de una cámara. Esto significa que el huevo encerrado podría ser fertilizado mientras está sujeto aun en la planta madre. Durante el desarrollo, el embrión podría alimentarse con reservas almacenadas, antes que el talofito se independizara. El éxito de las plantas con semilla se debe, en cierta medida, a la ventaja que se obtiene de la reproducción cuando la espora es retenida, protegida y provista de alimento. Lo cual contrasta con la condición en que la megaspora es liberada y el protalo se desarrolla independientemente.

Los helechos con semilla (pteridospermas) combinan características propias de los helechos. Los microsporangios de las pteridospermas son a menudo sinangios lo que favorece la transformación hacia las cicadáceas o bennettitales con la innovación de la envoltura floral y las flores hermafroditas. Plantas con estas características pudieron ser las que originaron a las antofitas (plantas con flores).

En las relaciones filogenéticas hasta aquí propuestas existen muchas dudas. También hay interpretaciones que divergen o se contraponen por lo que no existe un árbol filogenético que sea aceptado universalmente; no obstante, tenemos una idea general de la secuencia de cambios de las posibles relaciones filogenéticas de las plantas superiores.

En las coníferas modernas y en algunas otras plantas con semilla, el gametofito femenino, antes de la fecundación, crece mucho. Produce arquegonios y óvulos y acumula alimentos en abundancia. Después de la fecundación el cigoto es alimentado por esta reserva mientras se convierte en embrión.

En las plantas con flores predomina una condición diferente. Estas reciben de las plantas progenitoras la reserva alimenticia necesaria para el desarrollo y sostenimiento del embrión, y mientras la fecundación no se realiza, no hay acumulación de alimentos. Este patrón se considera una mejora en el proceso de reproducción porque no se gasta ninguna energía en acumular

reservas alimenticias para un embrión hasta que el embrión existe. En las plantas actuales con semilla, por lo general, la semilla se separa de la planta madre sólo cuando el embrión está completamente formado y bien provisto de alimentos (Wilson y Loomis, 1992)

Las primeras plantas con semilla siguieron líneas distintas. Unas de esas líneas se han extinguido; otras, principalmente las coníferas y las angiospermas, llegaron a ser notables entre las plantas actuales (Wilson y Loomis, 1992).

El análisis de secuencias del gen que codifica a la ribulosa 1,5, bifosfato carboxilasa (rbcL) ha confirmado la idea de que las coníferas, como miembros de las gimnospermas, podrían haber divergido primero de las pre-gimnospermas (Bousquet y col., 1992)

8. Angiospermas

El origen de las angiospermas ha sido propuesto por diferentes autores a partir de diversos grupos de vegetales. Descendientes de las Pteridospermas, Cayteniales, Gnetales, Cordiales y Bennettiales, han sido los grupos más aceptados como posibles ancestros de estas plantas.

Investigaciones paleontológicas y estratigráficas han demostrado que las primeras angiospermas han dominado la tierra desde, al menos, el Cretácico Bajo (Lidgard y Crane, 1988); sin embargo, no se tiene la certeza de contar con restos fósiles de las primeras plantas con flores. A los fósiles más antiguos de este grupo de vegetales, se les ha calculado una edad de 120 millones de años (en Martín y col., 1989), pero las características bien definidas de las angiospermas sugieren que estas se originaron hace 220 millones de años, aproximadamente, en el Cretácico Bajo (Lodgard y Crane, 1988; Les y col., 1991) y recientemente se ha propuesto una edad de hasta 300 millones de años, en el Carbonífero Inferior (Martín y col., 1993).

Se ha sugerido la posibilidad de un origen polifilético de las angiospermas (Martín y col., 1989) pero la presencia de caracteres únicos de este grupo, incluyendo la doble fertilización provee fuertes argumentos en favor de un grupo monofilético (Clear C.J., 1989; Crane y col., 1989).

Del análisis de secuencias del gen que codifica la rbcL se sugiere que posteriormente a la diversificación de las coníferas como miembros de las gimnospermas, se dio la diferenciación de angiospermas en dos clases básicas, las monocotiledoneas y dicotiledoneas, las cuales forman dos grupos monofiléticos (Bousquet y col., 1992), por el mismo método se ha corroborado la diversificación de las dicotiledoneas en seis subclases de acuerdo con Cronquist A. (1988)

La divergencia de las monocotiledoneas-Dicotiledoneas, probablemente se haya dado en el Carbonífero (hace 318 ± 35 millones de años (Martín y col., 1989) o hace 200 millones de años (Li W. y col., 1989) y la divergencia de las subclases de la dicotiledoneas en el Pérmico (276 ± 39 millones de años) (Clear, 1989)

Se cree que el origen de las angiospermas se dio entre plantas con semilla del mesozoico, tales como las bennitales y corystospermas (en Clear 1989). Los análisis cladísticos indican que las angiospermas están relacionadas con Bennettitales y Gnetales (en Crane y col., 1989)

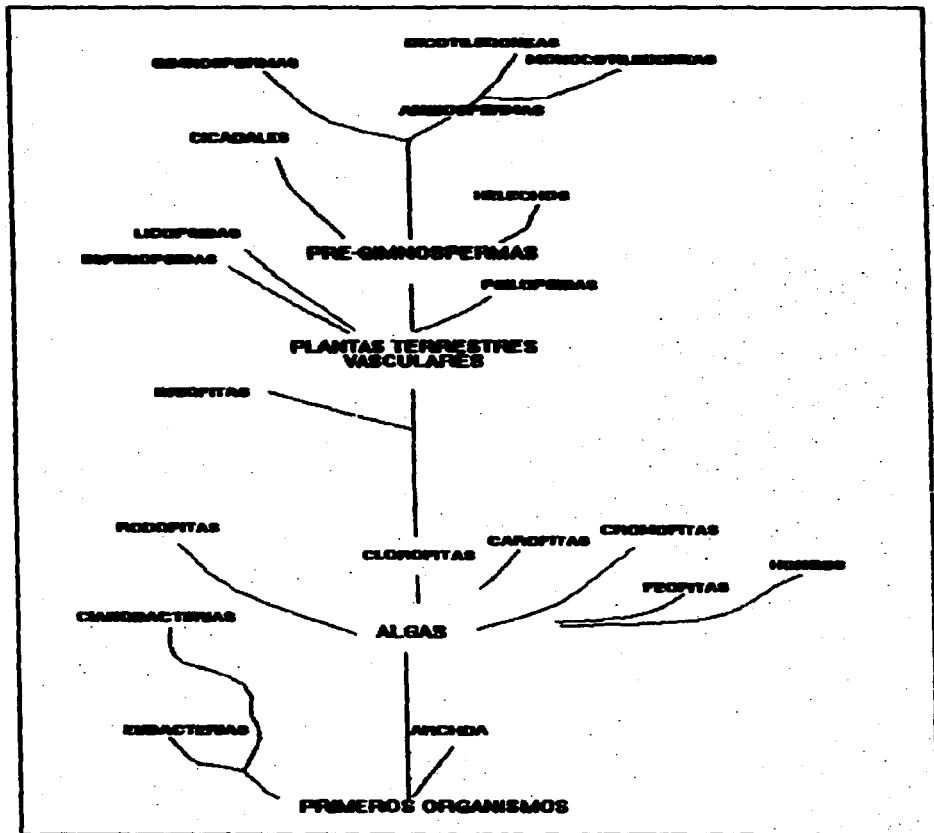


Fig. 5. Árbol genealógico de los grandes grupos de plantas actuales

B. Núcleo celular

1. Antecedentes históricos

El núcleo celular fue descrito por vez primera por Valentín al notar que el nucleolo, estructura observada por Fontana en 1777, se encontraba contenida en otra estructura menos refringente. En 1833, R. Brown dio el nombre de núcleo a esta estructura que contenía al nucleolo después de haberla observado por primera vez en 1827 en la epidermis de ciertas orquídeas (en Ford, 1993)

Las observaciones de otros investigadores (Brisseau-Mirbel en 1839, Purkije en 1836, Ekkchary y otros) permitieron que Shleiden y Swann consideraran al núcleo como una estructura constante en las células animales y vegetales.

En 1865, Fromman comprobó que los núcleos de las células de médula de bovino estaban rodeadas por una membrana, hoy denominada envoltura nuclear. Además, observó la presencia de un retículo que constituye su masa fundamental; Fleming dio el nombre de cromatina a ese retículo.

En 1871, Friedrich Meischer aisló una sustancia de carácter ácido y rica en fósforo de las células de pus y de espermatozoides de salmón. La sustancia, a la que nombró nucleína, fue purificada y analizada por Robert Altman quien la llamó ácido nucleico (Stent y Calendar, 1981).

Al finalizar el siglo pasado, se había demostrado la universal presencia de los ácidos nucleicos en animales y vegetales. A. Kossel, identificó los componentes de este ácido y en los años veinte de nuestro siglo, P. A. Evens y W. Jones demostraron que existen dos tipos fundamentales de

ácidos nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Stent y Calendar, 1981).

El desarrollo de los métodos de tinción y el perfeccionamiento para aislar y analizar los productos nucleares fueron determinantes para el actual conocimiento del núcleo. En 1903, Ramón y Cajal descubrió lo que llamó cuerpos accesorios del nucleolo mediante la impregnación de plata en tejido nervioso, hoy son conocidos como cuerpos espiralados.

Robert Feulgen y Rosemberk, en 1924, desarrolló un método de tinción específico para el ADN mediante el cual se demostró que este ácido es el componente más importante de la cromatina.

Brachet demostró en 1942, que el ARN intranuclear está concentrado principalmente en el nucleolo. Cuatro años después, Mirsky y Pollister dieron a conocer que el ARN se encuentra formando complejos con proteínas y obtienen las primeras evidencias de la existencia de una matriz nuclear, mediante el tratamiento de núcleos celulares con solución salina altamente concentrada y digestión con ADNasa.

En la década de los cuarentas, mediante los estudios citológicos sobre los ácidos nucleicos, se encontró una constancia cuantitativa del ADN por núcleo y las relaciones del ARN con la síntesis proteínica. En 1959, Stern y colaboradores determinaron que el ARN del nucleolo representa el 10% de la masa nucleolar, el 20% del ARN nuclear y el 1.6% del ARN total de la célula.

La elaboración de técnicas para el estudio de material biológico mediante el microscopio electrónico, incrementó notablemente el conocimiento de núcleo celular. En 1969, W. Bernhard da a conocer una técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas y en 1973, H. Vázquez Nin pone a punto la técnica de contrastación para cromatina, técnica de muy fácil realización.

En 1969, Monneron y Bernhard determinaron la naturaleza ribonucleoproteica de los granos intercromatinianos descubiertos por Smiff en 1958. De la misma manera se caracterizó a los

gránulos pericromatinianos descubiertos por Watson en 1962. Además descubrieron unas partículas fibrilares en la periferia de la cromatina, las cuales denominaron fibras pericromatinianas y determinaron la naturaleza ribonucleoproteica de los cuerpos espiralados. El estudio de las RNP durante las últimas dos décadas, ha permitido que se conozca más su papel fisiológico en el núcleo. Los granos pericromatinianos (GPC) parecen relacionarse con el almacenamiento y/o transporte del ARNm maduro (Echeverría y col. 1991) y los granos intercromatinianos (GIC), al parecer, son estructuras relacionadas con el almacenamiento y/o ensamblaje de proteínas y ARNs, involucrados en el procesamiento postranscripcional del pre-ARNm. Las fibras pericromatinianas son el sustrato morfológico de la transcripción (en Jiménez-García y col., 1989).

2. Ciclo celular en eucariontes

Todas las células están sujetas a un ciclo celular que involucra eventos nucleares y citoplasmáticos. A diferencia de los procariontes cuyo ciclo celular básicamente consiste en la replicación del ADN seguido de la división celular (en Darnell y col., 1990), en los eucariontes se dan complicados procesos que aun en la actualidad no son enteramente comprendidos.

Durante la vida de la célula se efectúan eventos coordinados entre el citoplasma y el núcleo. El proceso de división nuclear o mitosis, coincide con el proceso de citoquinesis o división del contenido citoplasmático. De igual manera, entre las fases de división nuclear y citoquinesis, núcleo y citoplasma se preparan para la siguiente división celular.

El período entre dos divisiones celulares se conoce como **interfase** y al núcleo de las células en esta etapa se le denomina **núcleo interfásico**. A partir de aquí, al hablar del núcleo se hará referencia al núcleo interfásico de células eucarióticas, de no ser así se habrá de especificar.

En células eucarióticas el ciclo celular abarca dos períodos: la mitosis y la interfase. En esta última, la función bioquímica más importante que realiza una célula es la síntesis de sus ácidos nucleicos (en Karp, 1987).

Al parecer existe un mecanismo universal (Nurse, 1990) que regula el ciclo celular por genes conocidos colectivamente como genes *cdc* (de cell-division cycle), factores promotores de maduración (MPF) y ciclina, principalmente. Este mecanismo posee puntos de control (Hartwell y Weinert, 1989) que no permiten continuar con la mitosis si no se han cubierto ciertos requisitos, uno de ellos es la replicación completa del ADN, así como su reparación en caso de que éste se haya dañado.

La regulación del ciclo en eucariontes parece depender, en gran medida, de los cambios de una simple molécula en la actividad de una proteína llamada proteína *cdc2*. La *cdc2* ha sido identificada como proteína quinasa, una enzima que transfiere fosfatos donados por ATP a proteínas. La *cdc2* permanece constante durante el ciclo celular pero su actividad es regulada por otra sustancia cuya cantidad en el interior de la célula va aumentando durante la interfase, alcanzando su concentración máxima a principios de la mitosis y baja al mínimo al iniciar la interfase, esta sustancia se denomina ciclina.

La ciclina es sintetizada en los inicios de la interfase y se acumula conforme avanza esta fase. Al conjugarse con *cdc2* forma el pre-MPF inactivo que, por acción de enzimas, sufre modificaciones y se transforma en MPF activo, el cual dispara la mitosis por una parte y por otra, activa las enzimas que degradan la ciclina liberando la *cdc2* para un nuevo ciclo.

La degradación de la ciclina es importante para el desarrollo de la mitosis y debe sintetizarse de nuevo cada interfase para activar MPF, inducir mitosis y dirigir el ciclo celular (Murray y Kirschner, 1991).

En los eucariontes, la síntesis del ADN, también llamada replicación, no se efectúa durante toda la interfase como comúnmente pasa en los procariontes (Darnell y col., 1990), sino después de un período de tiempo que transcurre finalizada la mitosis, a este período se le conoce como fase G1 (Gap). Después de efectuada la replicación transcurre otro lapso antes de entrar en mitosis, a este lapso se le conoce como G2 (Gap₂). De esta manera podemos decir que la interfase se divide en tres fases: G1, S, G2. La fase S corresponde al estado de replicación o síntesis del

ADN.

Se ha considerado al ADN como la materia básica de la vida, la molécula que rige el funcionamiento de la célula. En esta molécula reside la información que ordena la secuencia de aminoácidos en las proteínas.

El ADN está estructurado de unidades repetitivas de nucleótidos que contienen un azúcar (2'-desoxi-D-ribosa), un grupo fosfato, y una de las cuatro bases nitrogenadas heterocíclicas. Dos de estas bases son púricas y dos pirimidínicas (en Rawn, 1989). El carácter básico de los derivados púricos y pirimidínicos está proporcionado por los átomos de nitrógeno insertos entre los carbonos de los ciclos hexagonales y en su caso pentagonales, así como los grupos amino que se unen a dichos ciclos (en Morrison y Boyd, 1976).

La 6-aminopurina o adenina (A) y la 2-amino-6-oxipurina o guanina (G) se denominan bases púricas por su estructura semejante a la purina. La 5-metil-2,4-dioxipirimidina o timina (T) y la 2-oxi-4-amino-pirimidina o citosina (C) tienen la estructura básica de la pirimidina (P) (en Bohinski, 1978).

Cada una de las bases que estructuran el ADN están unidas al C-1' de la 2'-desoxi-D-ribosa mediante un enlace β -N-glicosídico para formar un N-glucósido o nucleósido y a la vez este nucleósido contiene en su posición 5' un grupo fosfato estructurando un nucleósido monofosfato o nucleótido. Estas estructuras: 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato o desoxiadenilato (dAMP), 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato o desoxiguanilato (dGMP), 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato o desoxicitidilato (dCMP), y 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato o desoxitimidilato (dTMP) los cuales se hallan unidos constituyendo diversas secuencias mediante puentes 5'-3' fosfodiéster (en Lehninger, 1991) son las unidades básicas que estructuran el ADN de los eucariontes.

Los nucleótidos pueden contener más de un grupo fosfato unidos covalentemente en secuencia lineal por enlaces fosfoanhidridos.

A partir de los datos empíricos de E. Chargaff sobre la composición de bases nitrogenadas del ADN y por estudios de difracción de rayos X en ADN cristalino, realizados por M. Wilkins y R. Franklin, la estructura tridimensional del ADN fue propuesta por James Watson y Francis Crick en 1952 (Watson y Crick, 1953) los cuales sugirieron que el ADN consta de dos cadenas polinucleotídicas en una estructura helicoidal orientada hacia la derecha, cada una enrollada alrededor de un eje perpendicular común moviéndose en direcciones opuestas. La doble hélice superenrollada se estabiliza por enlaces de hidrógeno intracadenas entre pares de bases nitrogenadas específicas, las cuales están proyectadas a partir de cada cadena hacia el centro de la hélice y en forma perpendicular al eje vertical.

Según el grado de hidratación del ADN se puede obtener en dos formas: la A y la B; se considera esta última como la forma biológicamente importante, la cual muestra dos periodicidades, la principal es de 3.4 Å y otra secundaria de 34 Å. Según el modelo de Watson y Crick consiste en dos cadenas de polinucleótidos dextro-helicoidales, enrolladas a un mismo eje y constituyendo una doble hélice. Sus puentes fosfodiéster 3',5' internucleotídicos se extienden en dirección opuesta. Las bases púricas y pirimidínicas de cada hebra se encuentran en el interior de la doble hélice formando uniones A-T y G-C mediante puentes de hidrógeno, con sus respectivos planos paralelos entre sí y perpendiculares al eje de la hélice dúplex (en Lehninger, 1991). Los grupos cargados negativamente le permiten unirse a los nucleosomas, que se encuentran estructurados por histonas que contiene aminoácidos cargados positivamente. La compactación del ADN en los nucleosomas lo fuerzan a adoptar un plegamiento necesario para su organización en la cromatina (Kornberg y Klug, 1981).

La replicación del ADN en los eucariontes presenta gran similitud con los procariontes, pero la complejidad en los primeros es mayor. En las células animales, por ejemplo, existen como mínimo cuatro diferentes ADN polimerasas en su núcleo; las polimerasas α , β , δ , ϵ . La ADN polimerasa α replica el ADN extendiendo un inductor en la dirección 5' \rightarrow 3' bajo la dirección de un molde de monohebra. La ADN polimerasa δ , al parecer, es la replicasa de la hebra conductora constituyendo un complejo con el ADN y unas proteínas llamadas **antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)**. La polimerasa ϵ tiene un gran parecido superficial con la

δ , sólo que la primera es altamente activa en ausencia de PCNA. Además la ADN polimerasa ϵ muestra una actividad como exonucleasa 3'→ 5' que sólo degrada ADN monohebra a oligonucleótido de 6 a 7 nucleótidos, y no a mononucleótidos como lo hace a polimerasa δ . La polimerasa β al parecer tiene funciones de reparación del ADN (Stern y Calendar, 1981).

En general la replicación del ADN en eucariontes podría explicarse de la siguiente manera:

Las dos hebras son desenrolladas localmente por una helicasa permitiendo la unión de la proteína desestabilizadora de la hélice o SSB (también conocida como factor de replicación A [RF-A]). Una topoisomerasa continúa desenrollando el dúplex de manera que la horquilla de replicación puede ir avanzando. El complejo ADN polimerasa α -primasa sintetiza un pequeño fragmento de ADN, inducido por ARN (fragmento de Okazaki), en cada hebra. Posteriormente se forma el complejo PCNA y otra proteína llamada RF-C; este complejo se une al extremo 3' de la hebra de ADN naciente. La ADN polimerasa δ se une al complejo y en sustitución de la ADN polimerasa α inicia la síntesis de la hebra conductora. La ADN polimerasa α recientemente liberada, se une al lado 5' de la hebra conductora naciente, donde se inicia la síntesis discontinua de la hebra retrasada. Los ARNs inductores son finalmente eliminados por una ARNasa H, los huecos son rellenos por una polimerasa, los cortes son sellados por una ADN ligasa y los dos ADNs dúplex hijos son desenredados y separados por la acción de una topoisomerasa.

Al parecer los preparativos para la fase S y G2 se efectúan desde la fase G1; en este período se sintetiza la ciclina y se reciclan las proteínas cdc, sustancias necesarias para iniciar la replicación del ADN (Kelly y col., 1993) y para activar las MPF. Las MPF a su vez inician la mitosis y activan las enzimas que degradan a la ciclina (Murray y Kirschner, 1991).

De acuerdo con el modelo de coordinación de la fase S y M propuesta por Joachim y col (1993), al salir la célula de la fase G1, se inician dos rutas distintas que rigen las dos posteriores fases de la interfase y en las que se decide la entrada o no a la mitosis. Una de ellas conduce hacia la entrada de la fase S y la iniciación de la replicación. La otra ruta conduce hacia la elaboración

de la maquinaria que lleva de la forma G1 a la G2 e inicia la preparación para entrar en mitosis. Las dos rutas son independientes y usualmente colaboran para asegurar que la fase S sea completada antes de iniciar la fase M. Un punto de control une las dos rutas mediante una señal que indica si el ADN ha sido completamente replicado, haciendo que la fase M dependa de la fase S. (Joachim y Deshale., 1993).

3. Ultraestructura del núcleo interfásico y sus funciones

La apertura numérica y la longitud de onda son los factores que limitan el poder de resolución de un sistema óptico (Lehmann y Wachtel, 1993). Debido a esto, el valor del límite de resolución de un microscopio óptico no puede ser menor de 17 000 Å (en Robertis, 1991). La posibilidad de rebasar el límite teórico del microscopio fotónico se dio con los avances teóricos de deBroglie sobre la naturaleza corpuscular y ondulatoria de un haz de electrones acelerados (Carnal y Mlynek, 1993). El microscopio que utiliza electrones acelerados sobre una muestra delgada del objeto de estudio, permite obtener un poder de resolución entre 0.2 y 0.25 nm. El aumento total puede variar entre unas pocas a 1 000 000 veces como máximo (Vázquez y Echeverría, 1984) lo que hace visible al ojo humano desnudo un objeto de 0.1nm².

El material orgánico debe adecuarse para ser estudiado en el microscopio electrónico. La fijación, deshidratación, inclusión, cortes de la muestra y contrastación son pasos del procedimiento general de cuya adecuada ejecución dependen los buenos resultados. La fase de contrastación, que consiste en la combinación de determinados compuestos químicos del material orgánico con átomos de elevado número atómico, es muy importante en el estudio de la ultraestructura del núcleo interfásico, ya que nos permite diferenciar las estructuras en función de cierta naturaleza bioquímica. La técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969) y la técnica de contrastación preferencial para la cromatina (Vázquez-Nin, 1973), han sido de gran utilidad para obtener los actuales conocimientos sobre el núcleo interfásico.

$$1 \text{ nm} = 10 \text{ \AA} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-7} \text{ cm}$$

En la tinción preferencial para ribonucleoproteínas se usa un método de contrastación general en el que se utiliza acetato de uranilo y posteriormente la acción del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para quelar, preferencialmente los iones de uranilo unidos a deoxiribonucleoproteínas; por esta razón, las ribonucleoproteínas se observan más contrastadas que la cromatina cuando se utiliza esta técnica. Por el contrario, el método de contrastación preferencial para la cromatina, el cual usa ácido fosfotúngstico sobre los cortes de tejido previamente incluido en glicolmetacrilato, destaca a la cromatina mientras las ribonucleoproteínas no aparecen contrastadas. Estas técnicas de contrastación, complementadas con otras técnicas como las de electroforesis en gel, secuenciación de nucleótidos y de autorradiografía de alta resolución (en Busch, 1983) entre otras, han sido utilizadas en la investigación para conocer la ultraestructura y función del núcleo.

A continuación abordaré la descripción de la estructura de los componentes del núcleo interfásico y sus funciones, dividiendo convencionalmente en cuatro partes: la envoltura nuclear, matriz nuclear, cromatina y estructuras ribonucleoproteicas.

a. Envoltura nuclear

El término de cubierta o envoltura nuclear indica que el núcleo está rodeado por una estructura semejante a un saco aplanado en vez de una simple membrana. La envoltura nuclear es una cisterna del sistema de endomembranas celulares, con una membrana externa y otra interna, las cuales mantienen una región entre ellas, generalmente libre de elementos estructurales referida como espacio perinuclear, lumen o espacio intermembranoso. Las membranas tienen alrededor de 100 Å de espesor y el espacio que los separa, de 100 a 150 Å; El grosor total de la envoltura es de 300 Å, pudiendo ser hasta 550 Å (en Robertis, 1991).

La envoltura nuclear consiste de tres dominios morfológica y bioquímicamente distintos: la membrana externa con ribosomas unidos, la membrana interna unida con la lámina, y el poro de la membrana unida con el complejo de poro (Chaudhary y Courvalin, 1993; Hallberg y col., 1993).

El dominio de la membrana nuclear externa se continúa con el retículo endoplásmico rugoso (RER) y contiene proteínas características del mencionado retículo. Una de las principales funciones de este sistema de membranas es la producción de las proteínas que se integran a las membranas, así como las destinadas a la exocitosis (Hallberg y col., 1993).

La membrana nuclear interna está unida a la lámina nuclear y/o a los componentes cromatinianos. Se ha propuesto que esta membrana actúa en la organización tridimensional de la cromatina (Blobel, 1985).

En los poros nucleares la membrana externa se conecta con la membrana nuclear interna. De esta manera la doble membrana es físicamente continua; sin embargo, son muy diferentes funcional y bioquímicamente. La membrana interna no contiene ribosomas y con frecuencia se encuentra una gran concentración de cromatina en su superficie (Dingwall y Laskey, 1992). Utilizando la fuerza centrífuga se demostró la unión de puntos de cromosomas a la membrana nuclear de células vegetales (Comings, 1978). También se ha usado centrifugación de células para demostrar la unión de la cromatina a la membrana nuclear y estudios de cromosomas de paquitenio en espermatoцитos de ratón efectuados con el microscopio electrónico, han demostrado claramente la unión de extremos de los cromosomas a la membrana nuclear (Foisner y Gerace, 1993).

La mayoría de los núcleos eucarióticos poseen envolturas con complejos de poros nucleares (CPN), los cuales son estructuras proteicas que tienen la función de mediar el transporte bidireccional de macromoléculas, así como la de jugar un papel en la organización tridimensional del genoma (Sukegawar y Blobel 1993; Hinshaw y col., 1992). El complejo de poro consta de dos anillos con un diámetro interno de 80 nm., uno sobre la superficie externa y otro en la interna en cuyo centro contienen un tapón desde donde se extienden 8 "rayos" hacia los anillos (Akey y Radermacher, 1993).

Estudios sobre fragmentos de estructuras aisladas de núcleos de animales y vegetales, con ayuda de la técnica de tinción negativa y el uso de rotación óptica, han hecho posible observar ocho

gránulos fibrosos de naturaleza ribonucleoproteica arreglados en forma simétrica que da una forma octagonal (Akey y Radermacher, 1993). En su lado nuclear también se encuentran los gránulos mencionados, y los poros están generalmente alineados con canales de nucleoplasma situados entre grumos de cromatina condensada, que se adhiere a una lámina fibrosa de proteína de 50 a 80 nm de espesor (en Robertis, 1991).

El canal del poro se encuentra ocupado por un material electrodenso y amorfo. Medidas de resistencia eléctrica de la envoltura nuclear, sugieren la posible existencia de un canal libre de estructura en el poro, al menos temporalmente (Panté y Aebi, 1993). Pequeñas moléculas (5000 daltons o menos) inyectadas dentro de la célula difunden a través de la envoltura nuclear. El aumento de peso molecular trae consigo un aumento en el tiempo de equilibrio en la difusión citoplasma-núcleo, y una inyección de proteína de forma esférica muy grande de 60 mil daltons casi no penetra al núcleo. Estos experimentos hacen suponer que el complejo de poro contiene un canal cilíndrico acuoso de unos 9nm de diámetro y 15 nm de longitud, a través de los cuales se pueden difundir iones y otras pequeñas moléculas. Sin embargo, aquellas que sobrepasen los 60 Kd, la mayoría de las proteínas, ARNs y partículas ribonucleoproteicas son incapaces de difundir a través de los complejos de poro y su transporte nucleocitoplasmático está basado en procesos activos asociados con el complejo de poro nuclear (Feldherr y col., 1984; Featherstone y col., 1988).

Por el CPN es por donde predominantemente, quizá únicamente, se transporta el ARN. La síntesis de la mayor parte del ARN celular ocurre en el interior del núcleo y etapas subsiguientes requieren transportar al ARN mensajero desde el sitio de síntesis del núcleo a un polirribosoma, localizado en el citoplasma. Desde 1955, Goldstein y Plaut habfan demostrado, mediante estudios autorradiográficos de la síntesis de ARN, un transporte de ácido nuclear hacia el citoplasma. Las evidencias morfológicas se dieron en la década siguiente, cuando observaron partículas ribonucleoproteicas atravesando el poro nuclear (Panté y Aebi, 1993). Como el diámetro de las partículas ribonucleoproteicas que pasan a través del poro es mucho mayor que el diámetro del canal, se supone que existe un transporte específico por un sistema de transporte activo. Además de los canales de los poros, las membranas nucleares podrían cumplir otras formas de

transporte, así lo hace suponer la existencia de ATPasa activada por Mg^{+2} asociada con la membrana y con los complejos de poro. Estas enzimas podrían contribuir al transporte activo de iones y moléculas a través de la membrana (en Avers, 1991).

b. Matriz nuclear

La matriz nuclear es un sistema esquelético del núcleo residual con propiedades dinámicas que tiene su función en importantes procesos biológicos como la síntesis de ADN; síntesis, procesamiento y transporte de ARN, y en la acción de hormonas (Barrack y Cottey; 1982; Cook, 1991; von Kries, 1991)

Las primeras evidencias de la existencia de la matriz nuclear, se obtuvieron mediante el tratamiento de núcleos celulares de timo de ternera con soluciones salinas altamente concentradas y digestión con DNasa. El resultado fue una estructura compuesta principalmente de proteínas, interpretadas como proteínas cromosomales residuales. Esta estructura contenía cerca del 8% de las proteínas no histónicas y 4% del total de los ácidos nucleicos. La primera observación con el microscopio electrónico de la estructura nuclear residual se efectuó usando de nuevo el tratamiento con soluciones salinas muy concentradas y digestión con ADNasa en núcleos de hígado de ratas.

Actualmente, la extracción de material nuclear se efectúa con tratamientos de soluciones salinas concentradas, combinadas con un lavado completo en cada etapa para eliminar compuestos solubilizados. En extracciones efectuadas en núcleos de hígado de rata, permanecen en la matriz nuclear el $10.0 \pm 0.57\%$ de proteínas, $1.3 \pm 0.21\%$ de ADN, $29.0 \pm 1.68\%$ de ARN y $2.2 \pm 0.5\%$ de fosfolípidos (Berezney y Coffey 1977; Barrack y Coffey, 1982). En general la matriz nuclear representa entre el 10 y el 20% de las proteínas no histónicas del núcleo.

El objetivo original de las extracciones había sido describir el mínimo componente residual responsable para mantener la integridad esférica del núcleo. Se han realizaron intentos adicionales para completar la digestión de los ácidos nucleicos remanentes, usando altas concentraciones de ADNasa 1 y ADNasa A, la estructura resultante es llamada matriz proteínica

nuclear. Esta matriz está estructurada por el $9.8 \pm 0.55\%$ de proteínas, menos del 0.01% de ADN, $3.0 \pm 0.12\%$ de ARN y $2.0 \pm 0.47\%$ de fosfolípidos (Barrack y Coffey, 1982). Ciertos componentes RNP son capaces de formar estructuras intranucleares que permanecen unidos a la lámina perinuclear dentro de condiciones definidas de extracción con altas concentraciones de sal (Bouvier y col., 1985).

La matriz proteica nuclear consiste de tres componentes morfológicos distintos: una lámina con complejo de poros residuales, una matriz fibrogranular interna y remanentes del nucleolo.

Una sección tangencial a través de esta envoltura residual, revela las estructuras características del complejo de poro, las cuales forman una parte integral de la envoltura nuclear intacta (Akey y Radermacher, 1993). La lámina con los complejos de poro residuales es una estructura continua que rodea la esfera nuclear, su grosor varía de un tipo celular a otro (Verheijen y col., 1988).

La lámina se encuentra entre la membrana interna y la cromatina periférica en forma de fibras entretrejidas, se le conoce como lámina densa, lámina fibrosa o lámina nuclear. En los eucariontes superiores la lámina está formada principalmente por uno o más polipéptidos llamados laminas*. En vertebrados las laminas han sido clasificadas en dos subgrupos según su secuencia primaria y propiedades bioquímicas (Nigg, 1989). Se piensa que esos polipéptidos se unen a proteínas específicas de la capa lipídica de la membrana interna, la asociación de ciertas laminas a la membrana parece ser debida a un derivado isoprenoide que está covalentemente unido a la terminación carboxilica de las laminas B y laminas A recién sintetizadas (Branton, 1981). Otros componentes asociados con la lámina se enlazan a sitios específicos sobre la cromatina en la interfase (Paddy y col., 1990); y con esto guían la interacción de la cromatina con la envoltura nuclear.

* La palabra esdrújula **lámina** se refiere a la estructura localizada entre la membrana interna y la cromatina, mientras que la palabra grave **lamina** se refiere a las clases de proteínas que componen dicha estructura.

Aunque no se conoce con certeza la función de la lámina densa, hay evidencias de que al menos juegan un papel importante en la disolución y estructuración de la envoltura nuclear durante la mitosis(en Alberts y col., 1989).

El ensamblaje de la envoltura nuclear y las laminas se deshacen durante la profase, cuando la lámina es despolimerizada y la membrana nuclear es fragmentada en cisternas y vesículas para luego dispersarse en el citoplasma. El reensamblaje tiene lugar durante la anafase y telofase, cuando membranas asociadas con cromosomas se fusionan y las laminas se reensamblan a la superficie del cromosoma. Se ha sugerido que tanto el desensamblaje de las laminas, como la liberación de la membrana nuclear de la cromatina durante la mitosis, son reguladas por fosforilación. La despolimerización de la lámina nuclear durante la mitosis se debe a la fosforilación de las laminas, en la telofase se desfosforilan y se polimerizan alrededor de la cromatina (Gerace y Blobel, 1980; Nigg, 1992))

Se ha demostrado que ciertos polímeros que forman parte de la envoltura nuclear y están asociados con laminas, juegan un papel clave en el reensamblaje de la envoltura nuclear durante la anafase tardía, así como la unión de las laminas a la envoltura nuclear (Foisner y Gerace, 1993)

La matriz interna fibrogranular se extiende por el interior del núcleo desde el nucleolo residual a la lámina periférica, esta red parece derivarse principalmente de la estructura intercromatiniana del núcleo.

Se han encontrado diferentes constituyentes nucleares asociados con la matriz, tales como ADN recién sintetizado (Hozak y col., 1993), ARN recién sintetizado, receptores de hormonas, antígenos virales, productos primarios de transcripción de ADNr y partículas ribonucleoproteicas nucleares de pequeño peso molecular (Sn RNP) (en Mah y col., 1993). Se desconoce gran parte de las causas de esas relaciones; sin embargo, se ha sugerido que la matriz nuclear juega un papel en el procesamiento del ARN heterogéneo nuclear.

La función de la matriz interna granular no es completamente conocida, pero existen evidencias que este juega un papel importante en la organización de muchas funciones nucleares tales como formación de vueltas de ADN, replicación y transcripción del ADN, regulación y expresión de los genes y ensamblado de la cromatina (Cook, 1991; von Kries, 1991). En la matriz nuclear encontramos asociaciones con algunas enzimas importantes en la replicación de la ARN polimerasa y de la ADN metilasa, importantes en la transcripción del ADN (Cook, 1991; Wood y Collins, 1986).

c. Cromatina

La cromatina es un complejo de macromoléculas que constituye el material cromosómico de la célula no mitótica (en Karp, 1987), está constituida por ADN, protefnas asociadas y ARN. El ADN fue ya descrito en la parte correspondiente a la fase S del ciclo celular, en donde se trató sobre la replicación de esta macromolécula, por lo tanto pasaremos a describir la parte proteica y la relación que esta tiene con la molécula de ADN.

En el núcleo encontramos protefnas histónicas y no histónicas, las primeras son una clase de protefnas básicas con un peso molecular de 8 000 a 26 000. A continuación describimos someramente a las cinco histonas que encontramos formando parte de la cromatina.

La histona H1 tiene un peso molecular de 20 000, es rica en lisina y ampliamente variable en las especies. La histona H2A tiene un peso molecular de 13 700, es relativamente rica en lisina y, desde el punto de vista evolutivo, es relativamente conservada en las especies. La H2B posee las mismas características de la H2A. La histona H3 tiene un peso molecular de 15 700, es rica en arginina y evolutivamente muy conservada en las especies.

En general podemos decir que alrededor de un 25% de los restos totales de los aminoácidos de las histonas pertenecen a la arginina, histidina y lisina a las cuales se debe la carga positiva que poseen las histonas. La lisina ocupa la mayor proporción de todos los aminoácidos; entre 10 y 20% del total. Exceptuando la H1 la evolución de las histonas ha sido extremadamente conservada en particular la H3 y H4. La relación de ADN-histonas es de 1:1 (en Karp, 1987)

En la cromatina se encuentran subunidades fundamentales repetidas denominadas nucleosomas o cuerpos nu que están constituidos de ADN e histonas (Kornberg, 1981; Inaga y col., 1991).

El núcleo de los nucleosomas está formado por un oligómero de histonas: dos unidades de H2A, dos unidades de H2B, dos unidades de H3 y dos unidades de H4. Las técnicas de difracción de rayos X y de neutrones sugieren que este octámero conforma una estructura cilíndrica de aproximadamente 1000 Å de diámetro y 500 Å de altura (Grunstein, 1992). Se ha demostrado que las histonas H2A y H2B, son capaces de intercambiarse dentro y fuera de la estructura del nucleosoma.

La histona H1, al igual que la H2A y la H2B, es intercambiable dentro y fuera de la cromatina. Sin embargo, no es parte del núcleo del nucleosoma y presenta algunas diferencias con aquellas. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las proteínas más conservadas durante la evolución, la H1 es la menos conservada de las histonas mencionadas (Kayne y col., 1988).

La cromatina en su nivel estructural más interna está ordenada de una forma simple mediante una subestructura fundamental repetitiva integrada por una agrupación nucleoproteica globular discreta, que contiene histonas asociadas a un fragmento de doble hebra de ADN de longitud determinada (Grunstein, 1992). Con nucleasa micrococcal se obtienen fragmentos de ADN de 140 pares de bases lo que hace suponer que el nucleosoma posee dos partes diferenciadas. Una de ellas correspondería al núcleo de la partícula constituida por el oligómero de histonas y la otra a la hebra de ADN de 140 pares de bases (Kornberg, 1981; Getzenberg y col., 1991). Sin embargo, las digestiones menos enérgicas producen partículas nucleoproteicas con un fragmento de hebra de ADN equivalente a 200 pares de bases nitrogenadas, lo que hace suponer que además de ADN estrechamente relacionado con el octámero, hay una parte de la hebra de ADN interconectado entre dichos octámeros. Cuando los fragmentos son mayores, equivalentes a dos o más nucleosomas, se puede demostrar la presencia de las cinco histonas, la H1 puede estar involucrada uniendo a los nucleosomas (Kornberg, 1981).

Los resultados de estudios por difracción de rayos X han demostrado que las histonas, exceptuando la H1, está densamente empaquetada. Por otra parte, no se aprecian en esta estructura orificios lo bastante espaciosos como para que quepa en ellos una molécula de ADN, por lo que se ha propuesto que el conjunto de histonas de la unidad estructural de un cromosoma es un complejo sólidamente empaquetado. El ADN asociado con las histonas debe estar unido a la parte exterior del complejo; una única y larga molécula de ADN, extendida a lo largo del cromosoma, pasaría de un juego de histonas al siguiente (Kornberg, 1981).

Los experimentos con difracción de neutrones llevados a cabo por John F Pardon y sus colegas (Pardon y col., 1977; en Bush Vol VI) aportaron pruebas de que el ADN está situado en la parte exterior del nucleosoma y la información procedente de los rayos X y la microscopía electrónica, hacen suponer que la disposición del ADN corresponde a la doble hélice de esta molécula enrollada en una hélice mayor o superhélice, dando aproximadamente dos vueltas en torno a la histona situada en medio de las partículas. Las dos vueltas de la superhélice deben hallarse muy próximas entre sí, pues la hélice de ADN mide 20 Å (Konberg, 1981; Noll, 1974 en Bush, 1983).

Actualmente se acepta que un nucleosoma se estructura cuando las histonas forman un complejo con el ADN. Este complejo, llamado partícula central nucleosomal, incluye en su centro dos copias de histona H3 y dos de H4. Este tetrámero H3-H4 está franqueado por dos dímeros H2A-H2B. En el extremo de cada molécula de histona se cree que hay prolongaciones semejantes a colas que salen de la partícula central nucleosomal interactuando con otras moléculas. En muchos organismos, pero no en todos, la H1 ayuda a anclar el ADN a la partícula central nucleosomal (Grunstein, 1992).

A partir de la disposición espacial, se ha deducido la participación individual de las histonas en el plegamiento del ADN sobre el tetrámero (H3)₂ (H4)₂, este define el giro central de la superhélice de ADN. Las H2A y H2B enlazan al ADN al inicio, centro y fin de una molécula de H1 (Adams, 1993), lo que completa la superhélice.

Se cree que la cromatina tiene otros niveles de compactación como el propuesto por el modelo de solenoide (Georgiev, 1978, en Bush, 1983), en este modelo los nucleosomas se disponen de forma helicoidal con un diámetro externo de 300 Å y un diámetro interno de 100 Å y una inclinación de 110 Å por vuelta. Cada vuelta contiene de 4 a 10 nucleosomas. La máxima compactación de los nucleosomas permitiría que solamente hubiera 2.7 nucleosomas por vuelta, por lo que se ha propuesto que la parte central podría contener a la histona H1, o proteínas no histónicas u otros elementos de control o bien ADN desnudo (Finch y Klug, 1976). El diámetro de la fibra de cromatina "in situ" es equivalente a 250-300 Å (Grosor de la fibra) ello es estable y discernible en la metafase, igual que la cromatina de interfase aislada después de dispersarla con disolventes catiónicos. Estas fibras se pueden convertir en fibras de 100 Å, las fibras de 200-300 Å son referidas como nucleómeros (Geddes en Bush, 1983) en donde los nucleosomas se empaquetan en forma de solenoide que se caracteriza por una elevación de 110 Å (el diámetro de un nucleosoma) y por un diámetro de cerca de 300 Å (6-7 nucleosomas por giro) formando una vuelta del solenoide. Los nucleómeros parecen ser entidades de los cromosomas metafásicos e interfásicos. Su estructura no es clara pero se cree que podrían ser interpretadas en términos de variaciones locales en unidades estructurales repetitivas. Microfotografías electrónicas de cromosomas, revelan anillos de fibras de cromatina que emanan de un eje central, lo que hace suponer que hay niveles superiores de organización (en Alberts, 1989).

El ADN no es la matriz directa que ordena las secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos se sintetizan en los ribosomas que se localizan en el citoplasma, por lo que se requiere de una matriz intermedia para transmitir información genética hacia los lugares de síntesis, por esta razón, para que la información contenida en el ADN sea interpretada deben efectuarse dos importantes procesos: la transcripción y la traducción.

Mediante la transcripción se producen moléculas de ARN con una secuencia de bases nitrogenadas complementarias al segmento de una de las hebras de ADN y por lo tanto complementarias para los genes programados para la formación de una proteína en particular. Para que se efectúe la transcripción, las hebras de ADN se separan durante uno o más estadios del ciclo celular y funciona como matriz a la que se acoplan los ribonucleótidos complementarios

mediante el apareamiento de bases: Adenina, Citosina, Guanina y Uracilo. Relacionados con la transcripción se encuentran las ARN polimerasas, proteínas de alta movilidad y otros factores (en Avers 1989).

En los procariontes la ARN polimerasa contiene cinco cadenas diferentes de polipéptidos β' , β , σ , α , ω , agrupados mediante enlaces secundarios. La molécula activa contiene un ejemplar de cada cadena específica, con excepción de la α que aparece dos veces. La unión de σ a las otras cadenas no es muy firme, de manera que es relativamente fácil aislar el agregado β' , β , α_1 , ω , el que se conoce como parte principal de la enzima, puesto que cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos tanto en presencia, como en ausencia de σ . La función de σ consiste en reconocer señales de iniciación a lo largo de la molécula de ADN.

Aparentemente la holoenzima reconoce inicialmente secuencias apareadas dentro de dobles hélices intactas, las cuales no son transcritas al ARN. Una vez establecida la unión al lugar de reconocimiento de la ARN polimerasa, esta última difunde hacia un punto cercano al de la iniciación de la transcripción a un segundo grupo de pares ricos en AT, al que se unen firmemente (sitio de unión de ARN polimerasa). La verdadera iniciación de cadenas no comienza en la región de ligamento más estable, sino a unas 6 a 7 bases más allá, a lo largo de la hélice doble. La primera base transcrita es púrica.

Una vez que comienza el alargamiento de una cadena, se disocia del complejo enzima núcleo-ADN-ARN naciente, quedando en libertad para asociarse a otra molécula núcleo. La transcripción se efectúa a lo largo del ADN hasta un lugar específico que actúa como señal de paro, una señal puede ser una serie de poli A.

La transcripción en los eucariontes sigue las mismas etapas básicas que en los procariontes pero es más compleja debido al tamaño del genoma eucariótico y a la presencia de las proteínas de la cromatina. A continuación se abordan algunas particularidades de la transcripción en eucariontes.

La estabilidad de las fuerzas iónicas fisiológicas de la cromatina, dada por la estructura de los nucleosomas, proporciona un obstáculo para la transcripción (Svaren y Chalkley, 1990). Para que ésta se lleve a cabo, las secuencias promotoras deben estar especialmente accesibles a la maquinaria de la transcripción (Devlin, 1992;). Es necesario que el estado de compactación de la cromatina sea al menos el de "cuentas de collar" ya que el mecanismo requiere de una desintegración y desplazamiento del nucleosoma (Adams, 1993). En las demás conformaciones empaquetadas incluida la estructura de 30 nm, el ADN eucariótico es inaccesible a las proteínas que se unen al ADN y al dispositivo de transcripción.

El producto intermedio de la transcripción de una unidad transcripcional en el ADN, es un ARN precursor llamado transcrito primario, el cual es modificado subsecuentemente a una molécula funcional madura. El transcrito primario tiene mayor secuencia de nucleósidos que el ARN final, la cual ha de someterse a un procesamiento que incluye modificaciones en las bases, en el azúcar, rearrreglo de los anillos de la piridina, formación de hélices y conformación terciaria, adición a la terminación 5', adición a la terminación 3', divisiones exonucleolíticas específicas, divisiones endonucleolíticas específicas, divisiones complejas con "splicing" de piezas y formación de complejos ARN-proteínas. El número, tipo y orden de eventos es diferente en cada grupo de ARN y frecuentemente varía para cada tipo específico dentro de los grupos.

A diferencia de los procariontes donde una sola molécula de ARN Polimerasa es usada para la transcripción, los eucariontes tienen tres diferentes ARN polimerasas: la ARN polimerasa I (RPI) que transcribe los genes del ARN ribosómico en el nucleolo, ARN polimerasa II (RPII) localizada en el nucleoplasma, transcribe los genes de las proteínas y a la mayoría de los snARNs, y la tercera es la ARN polimerasa III (RPIII) que también se localiza en el nucleoplasma y que sintetiza varias clases de moléculas pequeñas de ARN, ARN 5S, U6 SnARN y ARNt. Estas enzimas requieren proteínas auxiliares generalmente conocidas como factores para iniciar transcripción, de la correspondiente clase de promotores I, II, III. También requieren de polipéptidos enlazados a la caja TATA (TBP) (Aso y col., 1994; Sharp, 1992). Estas a su vez están íntimamente asociadas con otros polipéptidos conocidos como factores asociados al TATA (las TAFs) (Pugh y Tjian, 1992) para formar un complejo

multiproteico llamado TFIID (Dynlacht, 1991; Choy y Green 1993;)

Las ARN polimerasas de los eucariontes no se unen específica y directamente al ADN como lo hace la ARN polimerasa en los procariontes. La interacción entre las polimerasas y el ADN requiere de proteínas accesorias con especificidad de secuencia denominada factores de transcripción (TF) (en Rawn, 1989). Entre los factores de transcripción para la ARN polimerasa I están TFIA, TFIC, TFID, UBF-I, SLI y TIF-I. Algunos Factores de transcripción representativos de las ARN polimerasas II son: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIG, TFIIH TFIIS, RAP38, RAP74, BTF3, SPI y CTF. Los factores de transcripción de la ARN polimerasa III son: TFIIIA, TFIIIB, TFIIIC, Oct-1, SP1, ATF, PBP, TFIIR, (Pugh y Tijian, 1992; Sharp, 1992; Willis, 1993). En el caso de la RPI, RPIII, SLI y TFIIIB respectivamente son componentes del factor de iniciación, se piensa que TBP hace contacto no específico con los correspondientes promotores (Rigby, 1993). En el caso de la transcripción de la RPII, TBP interactúa con otras proteínas constituyendo el factor de iniciación TFIID y reconocimiento del elemento promotor TATA (Ham y col., 1994).

La ARN polimerasa I actúa a nivel del nucleolo, el producto de su acción es el pre-ARN 35-47S⁷, el cual es precursor de tres moléculas de ARNr, que en núcleos animales son el ARN 28S, ARN 18S y ARN 8S (Palmer, 1993).

En la mayoría de los eucariontes los genes de ARNr se encuentran en agrupamientos de 100 a 500 repeticiones separadas por ADN espaciador no transcribible, en esta regione se encuentra la secuencia promotora tanto en plantas como en animales (Doeling y col., 1993). Los promotores de la clase I consisten de varios sitios de unión que pueden dividirse en tres regiones importantes. La primera se extiende a lo largo del sitio de iniciación, generalmente de -40 hasta

⁷ S representa la constante de Svedberg, un coeficiente de sedimentación de 10⁻¹³ seg.

+20 ° y se requiere para la iniciación de la ARN polimerasa I. La segunda región se localiza entre el nucleótido -40 y -15, es la región de unión de factores de transcripción TFID, esta unión ayuda a la polimerasa a encontrar correctamente el sitio de iniciación. La tercera región se localiza entre -150 y -100, está implicada en la unión de factores de transcripción (en Rawn, 1989).

Los factores de transcripción se unen a varios sitios localizados antes del sitio de iniciación de las transcripciones. El TFID se une a la región -40, -15 y la UBF-1 se une entre -120 y -105. El TFIC se une al complejo TFID:gen de ARNr y el factor SLI lo hace al complejo UBF-I:gen del ARNr. A continuación la ARN polimerasa I se une a ambos complejos y completa la formación de la maquinaria de la transcripción. Al parecer la actividad transcripcional está limitada principalmente por alteración en la actividad de factores UBF y SLI que se asocian con RPI (Maeda y col., 1992). En estos mismos factores residen las propiedades de la RPI de ser relativamente especie-específica (Bell y col., 1989).

Los elementos del ADN que controlan la transcripción de la ARN polimerasa I en las plantas no han sido bien definidos pero existen evidencias de que en éstas también existen secuencias intergénicas del ARNr (Tremousaygue, 1992; Vincentz y Favell, 1989) y de secuencias promotoras de la transcripción entre los nucleótidos -91 al 22 (Doelu, 1993).

Algunas de las enzimas que llevan a cabo el procesamiento del ARN son partículas ribonucleoproteicas. En algunos casos el ARN componente de las partículas ribonucleoproteicas es la subunidad activa de la enzima. Las enzimas cuya subunidad de ARN lleva a cabo reacciones catalíticas son llamadas ribozimas. Hay cuatro clases de ribozimas. Tres de ellas llevan a cabo reacciones de auto procesamiento, mientras la cuarta, ribonucleasa P (RNasa P), es una verdadera catalizadora (Gerlach y Robaglia, 1993).

Convencionalmente los nucleótidos se enumeran respecto al punto de inicio de una región que se transcribe o unidad de transcripción. A los nucleótidos a la derecha del punto de inicio se le asignan valores positivos. Los nucleótidos situados a la izquierda del punto de inicio se les asignan valores negativos.

Un ejemplo de autoprocésamiento lo tenemos en el ARNr de *Tetrahymena thermophila*. Los intrones, secuencias no codificadoras presentes en el ARNr recién transcrito, son removidos del precursor de ARNr. Una guanosina o guanosidina reacciona en la unión fosfodiéster intrón-exón para dislocar el exón donador del intrón. Esta reacción es promovida por su propia estructura secundaria. El exón donador libre ataca similarmente al enlace intrón-exón fosfodiéster en el aceptor final del intrón.

La ARN polimerasa II transcribe los genes de los ARN premensajeros (ARNm-pre) y varios genes que codifican a moléculas pequeñas de ARN involucrado en el procesamiento de otras moléculas de ARN. Bajo condiciones de transcripción basal, TFIID puede unirse al ADN directamente o formar un complejo de TFIID inducido por un arreglo de factores asociados a TATA (TAFs). Parece que hay muchas clases de complejos compuestos de TFIID más TAFs y/o coactivadores (Greenblatt, 1992). Posteriormente a la formación del complejo de IID-ADN, TFIIF instrumenta la entrada de poli II (en un estado no fosforilado) al complejo de transcripción. Después de que el complejo básico está establecido, TFIIE ayuda a estimular la fosforilación del dominio C-terminal del poli II. La fosforilación lograda por multiunidades de quinasa, incluidas TFIIH y TFIIJ, hacen el ensamblaje operacional para iniciación de la transcripción y elongación (Li y col., 1994).

La adición de la estructura cap ocurre durante la transcripción por ARN polimerasa II. Como el complejo de transcripción se mueve a lo largo del ADN, el complejo de enzimas "capping" modifican la terminación 5' del ARNm naciente.

Después de iniciar la síntesis del "cap", la ARN polimerasa continúa transcribiendo al gen hasta un signo de secuencias poliadeniladas. Esta secuencia, la cual tiene el consenso AAUAAA, aparece en el ARN maduro pero usualmente no forma parte de la región codificada del mensajero. Más bien funciona como un signo para la región de hendidura del ARNm precursor naciente, alrededor de 20 o más nucleótidos antes. La secuencia de poli(A) es añadida por una polimerasa soluble a la terminación 3' que resulta de esta escisión.

Muchos de los genes codificados por la ARN polimerasa II, contienen una secuencia de consenso TATANA similar a la caja TATA de los procariotes. Se localiza en el lugar probable en donde comienza el desenrollamiento de la hélice de ADN. En mamíferos la caja TATA interacciona con un factor general de transcripción llamado TFIID el cual se enlaza con la proteína TBP (de TATA-element-binding). Esta proteína está involucrada en la iniciación de transcripción de las tres ARN polimerasas (Sharp, 1992; Rigby, 1993) y juega también un papel importante en la replicación del ADN (Kornberg, 199; Chasman y col., 1993). El ensamblaje del complejo de iniciación procede por encima de la unión del ADN con TFIID (que reconoce la caja TATA) generalmente estabilizado por TFII y/o TFIIB (Bungert y col., 1992).

Entre la región -80 y -60 existe frecuentemente otro promotor conocido como región CAAT que corresponde a una secuencia GGNCAATCT. Esta región es reconocida por el factor de transcripción CTF (Factor de transcripción de la región CAAT). Otra secuencia de consenso en los promotores de los genes codificados por la ARN polimerasa II es GGGCGG implicada en la unión del factor transcripción SP1.

Como el ARN está estructurado desde el complejo ARN polimerasa, éste es rápidamente enlazado por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares snRNP. Cada una de esas especies de snRNP está compuesta de un sólo ARN rico en uridina y algunas proteínas. La U1 snRNP lleva a cabo una función esencial en la remoción de intrones por reconocimiento del sitio "splice" 5.

Todos los intrones empiezan con una secuencia GU y terminan con AG. Entre estas secuencias se encuentra un residuo de adenina situado a unos 40 nucleótidos más arriba del sitio de "splicing" 3'. Estos tres sitios constituyen las secuencias consenso en el ARNm que desempeñan un papel importante en el proceso de "splicing" (Rawn, 1989).

La discriminación para remover la secuencia GU está acompañada por la formación de pares de

***Se le llama secuencias de consenso a aquellas que se derivan del consenso de varios ejemplos que proporcionan un patrón común de los promotores.**

bases entre el ARN U1 y la secuencia del ARNm precursor precediendo y plegando este dinucleótido. Otra snRNP conteniendo ARN U2 reconoce importantes secuencias en el extremo 3' del intrón. No obstante otra especie de snRNP después enlaza al precursor ARN, formando un largo complejo de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (SnRNPs) y factores proteicos no-SnRNP. Este proceso se efectúa mediante transesterificación que requiere ATP (Kim y Cin, 1993) y el complejo es llamado un spliceosoma (por analogía con el gran complejo ribonucleoproteico involucrado en la síntesis de proteínas, el ribosoma) (Steitz y col., en King y Lin, 1993). Este complejo, el spliceosoma, es el sitio en donde se efectúan dos reacciones de transesterificación usando energía de ATP para llevar a cabo la remoción exacta del intrón (Guthrie, 1991). Primero, el nucleótido enlazado es roto dejando un grupo 3'-OH libre en la terminación del primer exón y un fosfato 5' sobre la guanosina donadora del intrón. Esta pG es usada para formar un enlace no frecuente con una adenosina en el intrón. El fosfato 5' de la guanosina donadora está ligada al grupo 2'-OH de esta adenosina para formar una ramificación o estructura ARN en forma de lazo. Nótese como la estructura ramificada está compuesta enteramente de secuencias del intrón. Después que el lazo está formado, al final de las reacciones el intrón, es removido por un corte que ocurre alrededor de 20 nucleótidos abajo de la ramificación. Posteriormente se unen las dos secuencias de exones.

En genes con un gran número de intrones, los intrones son removidos generalmente en secuencia desde la terminación 5' a la 3', aunque esto no es del todo estricto. El resultado final de todo este proceso es un ARNm completamente funcional, en donde todos los exones quedan listos para dirigir la síntesis de proteínas (en Rawn, 1989).

La ARN polimerasa III al igual que la ARN polimerasa II se localiza en el nucleoplasma y transcribe los ARN de transferencia y el ARNr 5S. Su función es mejor conocida que las otras polimerasas (Willis, 1993).

Los factores de transcripción de los genes de la clase III se unen a regiones internas de control (ICRs). En el caso del gen ARNr-5s contiene también elementos intermedios (IE) implicados en la formación del complejo de transcripción. Los factores de transcripción TFIIB y TFIIC

se unen a las ICR de los genes del ARNt. El TFIIC se une en primer lugar al bloque B, para posteriormente alinearse sobre el gen mediante el contacto con los nucleótidos del bloque A. Una vez que el TFIIC se ha unido, el TFIIB se suma al complejo TFC-gen del ARNt. El TFIIB no está en contacto con el ADN, pero sí con el TFCIII mediante interacciones proteína-proteína. La presencia de este complejo sobre el gen del ARNt permite a la ARN polimerasa III iniciar la transcripción en el sitio +1. Una vez formado, el complejo de transcripción permanece asociado de forma estable al gen para iniciar ciclos múltiples (Willis, 1993).

El fin de la transcripción se efectúa, al igual que en procariontes, mediante un mecanismo que depende solamente de la secuencia del ácido nucleico (Hippel y Yager, 1992).

El ARN de transferencia es modificado por división, adición, y modificación de sus bases. El correcto reconocimiento de ARNm por el ARNt y la correcta aminoacilación del ARNt específico, es importante (Lee, 1993) y necesita ser rigurosamente controlado. Gran parte de la especificidad de la función del ARNt reside en modificaciones de sus nucleótidos.

Los productos de transcripción de un gen ARNt contiene secuencias de nucleótidos extra en ambos extremos 5' y 3' con respecto a la secuencia de ARNt maduro. En algunos casos esos transcritos primarios contienen intrones en la región del anticodón del ARNt. La reacción ocurre de manera bien definida pero no necesariamente en un orden temporal rígido. Al principio, el transcrito primario es ajustado (o cortado) de una manera no específica para producir una molécula precursora. Después la ribonucleasa P remueve el extremo 5' por división endonucleolítica. La terminación 3' se corta exonucleolíticamente, seguido por síntesis de la terminación C-C-A_{OH}. La síntesis del nucleótido modificado ocurre en cualquier orden relativo al corte nucleolítico. El intrón removido es dictaminado por la estructura secundaria del precursor y es llevada a cabo por un sistema enzimático de dos componentes; una enzima remueve el intrón y la otra sella la cadena de nucleótidos.

Los nucleótidos del ARNt son los más altamente modificados de todos los tipos de ácidos nucleicos. Más de 60 diferentes modificaciones que se efectúan en las bases y en la ribosa,

requiriendo alrededor de 100 diferentes reacciones enzimáticas, muchas son simples metilaciones en una sola reacción, pero otras involucran múltiples reacciones.

Una enzima o conjunto de enzimas produce una sola modificación específica de un sitio en más de una especie de moléculas de ARNt. Enzimas separadas o conjuntos de enzimas producen la misma modificación en más de un lugar en ARNt. En otras palabras, la mayoría de las modificaciones enzimáticas son específicas de sitio o de secuencias de nucleótidos, no de ARNt.

Todas las modificaciones del ARNt son efectuadas postranscripcionalmente. La mayoría son completadas después que el precursor del ARNt ha sido ajustado al tamaño del ARNt maduro.

d. Estructuras ribonucleoproteicas

Las estructuras ribonucleoproteicas se pueden dividir en dos grupos: el nucleolo y las ribonucleoproteínas extranucleolares. El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento de ARN prerribosomal (pre-ARNr) y del ensamblado de ribosomas, las partículas ribonucleoproteicas extranucleolares son lugares de almacenaje y/o transporte y/o procesamiento de ácido ribonucleico. Las partículas ribonucleicas extranucleolares son: las fibras pericromatinianas (FPC), gránulos pericromatinianos (GPC), cuerpos espiralados (CE), cuerpos nucleares (CN) y gránulos intercromatinianos (en Jiménez García y Segura-Valdez, 1993).

Nucleolo

El nucleolo es generalmente esférico y su diámetro varía entre una a tres micras. Se forma en un sitio específico del cromosoma, el cual es llamado organizador del nucleolo o Nor (Nucleolar Organizing Region), a partir del cual se transcribe el pre-ARNr. Los genes de ARNr o ADNr, son transcritos simultáneamente a partir de una hebra continua del ADN. Las moléculas son procesadas en el núcleo en donde también pueden unirse con proteínas ribosomales para formar subunidades ribosomales inactivas o precursoras (Ritossa y Spigelman, 1960; Miller, 1973).

La ultraestructura del nucleolo difiere un poco en los diferentes organismos pero en general consta de los centros fibrilares, la región fibrilar densa y la región granular.

Los centros fibrilares son regiones con baja densidad a los electrones. Están constituidos por fibras de alrededor de 50 Å de espesor las cuales se encuentran rodeadas total o parcialmente por el componente fibrilar denso. Contienen ARN polimerasa I, el factor de transcripción nucleolar y otras proteínas nucleolares. Esta zona ha sido interpretada como una estructura de almacenamiento de ADN interactivo mantenido en reserva y se ha demostrado que la transcripción del DNAr ocurre en la periferia de los centros fibrilares (Mirre y Stahl, 1981).

Mediante autorradiografía se ha observado la biosíntesis "in situ" del ARN prerribosomal en la parte fibrilar del nucleolo (Angelier y col., 1979). La síntesis de ARN prerribosomal se completa tan pronto como las fibras ribonucleoproteicas alcanzan su máxima longitud y no hay liberación de la correspondiente fibra, esto resulta de un almacenamiento de esas fibras por un período de tiempo. De esta manera los componentes fibrilares densos representan la forma transcripcionalmente activa del nucleolo.

Las moléculas de ARN ribosomal producidas en la zona de los componentes fibrilares densos se asocian con proteínas y se procesan en la forma de una red de ribonucleoproteínas embebidas en una matriz fibrosa. Recientemente se han localizado los genes de ADNr en la región fibrilar densa del nucleolo por medio de hibridación *in situ* ultraestructural, lo que es compatible con los resultados de autorradiografía (Jiménez García y col., 1993).

Los componentes granulares se constituyen por partículas individuales de ARNpr conteniendo las moléculas de ARNr precursor, (Knibiehler y col., 1982). Los nucleolos inactivos en la síntesis de ARN ribosomal carecen de zona granular son predominantemente de estructura fibrosa.

Además de las regiones anteriormente descritas, el nucleolo puede contener una región fibrogranular, conocida también como nucleolonema. En ocasiones se encuentran en él, espacio ovalados o esféricos ricos en pre ARNr y muestra la presencia de fibras dispersas, a estos espacios se les llama "vacuolas nucleolares" (en Jiménez-García, 1985) su presencia, número

y tamaño se han correlacionado con las condiciones fisiológicas de la célula.

Después de una extracción salina, en el nucleolo se observa un material amorfo con fibras y granos a la que se ha nombrado matriz nucleolar (Jordan, 1984).

Fibras pericromatinianas

La utilización de la técnica de Bernhard, permite visualizar estructuras que contienen ARN y proteínas, esto es ribonucleoproteínas (RNPs). Monneron y Bernhard (1969) descubrieron las partículas fibrilares en la periferia de cúmulos de cromatina las cuales denominaron fibras pericromatinianas (FPC).

La técnica de Bernhard, que es una tinción negativa preferencial para estructuras RNP y la autorradiografía de alta resolución después de encubar a células por un corto tiempo con uridina tritiada (Fakan y Bernhard, 1973), permitieron deducir que las FPCs contienen ARN recién transcrito sobre la periferia de la cromatina condensada, es decir el ARN mensajero inmaduro (pre-ARN^m) y proteínas relacionadas con la maduración del pre-ARN^m. (Fakan y col., 1984).

El diámetro de las FPCs mide alrededor de 5 nm, aunque su grosor presenta gran variabilidad ya que pueden medir hasta 20 nm. El número de estas fibras es muy variable, se incrementa notablemente cuando en la célula se estimula la transcripción del ARN (Nash y col., 1975).

Granos pericromatinianos.

Estas estructuras fueron descritas por Watson en 1962 como de tipo granular, distribuidas en la periferia de cúmulos de cromatina. Los gránulos pericromatinianos (GPC) miden alrededor de 40 nm de diámetro y están rodeados con un halo transparente a los electrones cuya naturaleza se desconoce.

La naturaleza RNP de los GPCs fue descubierta mediante la técnica de Bernhard y al igual que las FPC son sensibles al tratamiento secuencial de pronasa y ARNasa (Monneron y Bernhard, 1969).

Cuando el metabolismo de la célula se altera, puede producirse un notable incremento en el número de GPC. Esto se puede efectuar por variación de la temperatura, infección viral o la administración de drogas como el cloruro de cadmio, las cuales disminuyen el procesamiento de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn) y el transporte de estructuras RNP (Fuvion y Lang, 1980).

Investigaciones recientes efectuadas en células de la próstata ventral de rata castrada revelaron que el número de los granos pericromatinianos es un 79% más alto que el control y que una inyección de testosterona causa en 15 minutos una reducción a niveles del 33% con respecto a los castrados. Por otra parte la autorradiografía de alta resolución demostró que el transporte de ARN previamente sintetizado aumenta mucho más que la síntesis. Estos resultados sugieren que los granos pericromatinianos contienen ARNm de pocos genes almacenado en el núcleo por restricción en el transporte hacia el citoplasma (Echeverría y col., 1991). Al parecer estas estructuras están relacionadas con el almacén y/o transporte de ARNm maduro (Vázquez-Nin y col., 1983; Echeverría y col., 1991).

Cuerpos espiralados

Los cuerpos espiralados contienen material relacionado con el metabolismo del pre-ARNr y de pre-ARNm (Brasch y Ochs, 1992)

Los cuerpos espiralados (CBs) son organelos nucleares en las cuales hay algunos factores del splicing como son los snRNPs. Se observan algunas veces en asociación con la periferia del nucleolo, no contienen ARNt 5S, ni 28S. Esto se contraponen con la función propuesta para los CBs en la maduración o transporte de ARNt, como anteriormente se ha sugerido. Se han presentado evidencias de que CBs son estructuras cinéticas y que la formación de CBs conteniendo snRNP regulada en interfase y mitosis. Por otro lado, contienen también U3 snARN (Jiménez-García com. per.). Su función resulta enigmática pues contienen factores de maduración, tanto del pre-ARNr como del pre-ARNm; sin embargo, no contienen las moléculas sustrato.

Durante la mitosis, los CBs se desensamblan, coincidiendo con una fosforilación de la p80 coilina específica de la mitosis. La coilina muestra ser una fosfoproteína que es fosforilada al menos en dos sitios durante la mitosis. Los CBs se reforman en núcleos hijos después de un período durante el cual no se detectan. Los cuerpos espiralados son dinámicos organelos nucleares y se ha propuesto que la interacción de las snRNPs relacionadas con el splicing con CBs puede ser importante para su participación en el procesamiento o transporte de pre-ARNm en células de mamíferos.

Granos intercromatinianos

Los gránulos intercromatinianos son estructuras granulares de 10 a 20 nm de diámetro que se localizan formando cúmulos entre la cromatina compacta (Swift, 1963). Al parecer son estructuras relacionadas con el almacén y/o ensamblado de proteínas y ARNs, involucrados en el procesamiento postranscripcional del pre-ARNm.

II. OBJETIVOS

- A. Definir las características morfológicas ultraestructurales del núcleo de plantas pertenecientes a grupos taxonómicos de distintos niveles evolutivos.**
- B. Estudiar posibles cambios en la ultraestructura del núcleo celular interfásico derivado de los procesos evolutivos en los grandes grupos de vegetales, en particular los relacionados con el proceso de maduración del pre-RNA_m.**
- C. Determinar si las diferencias estructurales de los núcleos estudiados pueden servir como base para inferir aspectos evolutivos en grupos taxonómicos de los vegetales.**

III. MATERIAL Y MÉTODO

El estudio de la ultraestructura celular se hace en imágenes fotográficas. En estas imágenes ha de efectuarse el reconocimiento y cuantificación de las estructuras que integran al núcleo y en general los estudios de la célula. El material biológico debe procesarse de forma adecuada para soportar las condiciones internas del microscopio electrónico, para efectuar la observación y obtener la imagen en una placa fotográfica. El proceso consta de los siguientes pasos generales: fijación, deshidratación, preinclusión, inclusión, corte, contraste, fotografía y análisis de la imagen.

A. Fijación

La fijación es la preservación de la estructura de un tejido vivo después que ha dejado de efectuar las funciones vitales. Este fenómeno implica la suspensión del proceso de autólisis a la vez que el tejido se protege contra deterioro durante las siguientes etapas a que ha de someterse; de esta manera, el fijador es una solución hecha con una o más sustancias que interrumpen los procesos biológicos, conservando los tejidos vivos de la manera más semejante al estado en que se encontraban (Luft, 1992).

Para fijar el tejido, el material seleccionado debe dividirse en fragmentos menores a un milímetro cúbico. Estos fragmentos se introducen en un recipiente que contiene un volumen adecuado de una sustancia fijadora. Las sustancias que más se utilizan para este fin en microscopía electrónica son el glutaraldehído (Sabatini y col., 1963; Hopwood, 1972) y el tetraóxido de osmio (Porter y Kullman, 1953), aunque también se utiliza el formaldehído y permanganato de potasio entre otros (Kettering, 1971).

El glutaraldehído es un compuesto formado por una cadena de 5 carbonos en cuyos extremos se encuentran grupos funcionales aldehídicos. Estos grupos aldehídicos reaccionan con los grupos amino de los aminoácidos que estructuran a las proteínas y se establecen puentes entre ellas. De esta manera se fortalece la función estructural de las proteínas (Hopwood, 1972;

Richards y Knowles, 1968; Puracchia y Mittler, 1972).

El tetraóxido de osmio, a diferencia del glutaraldehído, afecta a las moléculas lipídicas en sus doble ligaduras, formando puentes oxígeno-osmio-oxígeno entre las moléculas de lípidos. Como el osmio es un metal pesado, no sólo fija a la célula, además forma complejos entre los átomos de osmio y las macromoléculas celulares, lo cual las hace electrónicamente densas y visibles al microscopio electrónico. El tetraóxido de rutenio puede utilizarse con los mismos fines que el tetraóxido de osmio (Naito y col., 1991). Como los compuestos aldehídicos actúan sobre proteínas y el tetraóxido de osmio sobre los lípidos, cuando se utilizan las dos sustancias sucesivamente como fijadoras en un mismo tejido, por lo general se obtiene excelente resultado del material en estudio (Hopwood y Milne, 1992).

El formaldehído actúa de manera similar al glutaraldehído, pero como sus moléculas son más pequeñas y tiene sólo un grupo carbonilo, la formación de puentes entre proteínas es menos eficiente. No obstante cuando se usa mezclado con glutaraldehído se obtienen buenos resultados.

Los fijadores son fluidos que estabilizan los constituyentes del tejido tan rápido como es posible. Para que el fijador actúe adecuadamente es necesario utilizarlo en concentración, pH y temperatura adecuada al tejido en proceso.

La calidad de la fijación depende de la invariabilidad en el pH durante el proceso de fijación, por lo que debe utilizarse mezclado con un amortiguador (Luck, 1980) que conserve el pH entre 5.5 y 7.5. El uso de soluciones de fosfato y cacodilato como amortiguadores evita los cambios drásticos en el pH del tejido en donde se efectúa la fijación y con esto se evita la producción de artificios (Bozzola y Russell, 1992). Por otra parte los amortiguadores adecuan la tensión osmótica del vehículo del fijador (Vázquez-Nin com. per.)

La fijación en este trabajo se efectuó en fragmentos de la planta de un tamaño menor a un milímetro cúbico. Para esto se usaron los siguientes procedimientos según el caso.

Paraformaldehído-Glutaraldehído. La fijación se efectuó con una mezcla de paraformaldehído 3.4% y glutaraldehído 6.4% en partes iguales. Por cada 10 m de esta mezcla, se usó 4.5 m de piperazina N-N bis (ácido 2-etanol sulfónico) 0.08 M como amortiguador y 6.25 mg de cloruro de calcio. El tiempo de la fijación fue de 24 horas a una temperatura de 4 °C.

B. Deshidratación

La deshidratación es el proceso de reemplazar el agua que contienen las células, con un fluido que actúa como solvente entre el medio acuoso de la célula y el medio hidrofóbico del material utilizado para la inclusión.

Una vez que los fragmentos del material en proceso han estado inmersos en el fijador durante el tiempo necesario, se procede a la deshidratación del material biológico. Para ello, se somete a la acción del alcohol etílico o acetona aumentando gradualmente su concentración hasta llegar al alcohol o acetona al 100%. La deshidratación es necesaria porque la resina epóxica que se ha de emplear en el paso siguiente, que es la inclusión, no se mezcla con sustancias acuosas. Además, si no se deshidrata, el agua causaría problemas en la columna del microscopio electrónico (Bazzola y Rusell, 1992).

Para la deshidratación se utilizó en algunos casos acetona, pero en la mayoría se usó alcohol.

ACETONA. La deshidratación con acetona se efectuó al 25, 50, 75, 95, y 100%. en una mezcla acetona-agua. El tiempo en cada mezcla fue de 15 minutos. Se hicieron dos cambios en acetona al 100%.

ALCOHOL. La deshidratación se efectuó mediante alcoholes con un aumento gradual en su concentración. El alcohol inicial fue de 10% y se fue aumentando de 10 en 10 grados hasta alcohol absoluto, en este último se hicieron tres cambios. El tiempo en que se mantuvieron los fragmentos en cada alcohol fue de 10 minutos con excepción del alcohol absoluto en donde estuvieron 30 minutos.

C. Preinclusión

Previo a la inclusión, el material biológico requiere de un proceso en el cual, el contenido acuoso del tejido sea sustituido por una sustancia capaz de disolver el material que ha de usarse para la inclusión.

D. Inclusión

La inclusión es el proceso por el cual el agente deshidratante o fluido de transición es reemplazado por monómeros plásticos líquidos (Hopwood y Milne, 1992). Los plásticos más utilizados para este fin son: Epón, Araldita, VCD (dióxido de vinil hexano), compuesto descrito por Spurr y glicol metacrilato.

Para incluir con epón, el material deshidratado se introdujo en óxido de propileno. El óxido de propileno es un agente intermediario que condiciona el tejido para la pre-inclusión. La preinclusión consiste en introducir el material en una mezcla de óxido de propileno y una mezcla epóxica al 50% durante 24 hrs a temperatura ambiente. Después de la pre-inclusión los fragmentos se colocan en moldes prismáticos o cilíndricos, con extremos estrechos y se les agrega resina no polimerizada de una mezcla epóxica.

Los componentes de la mezcla epóxica son: una resina, un polimerizador y un acelerador. Generalmente la resina es epón 812. El anhídrido dodecil succínico (DDSA) y el metil 2,4,6-tridimetilamino fenol (DMP-30) son el polimerizador y acelerador respectivamente que se usan en las mezclas epóxicas.

Para la araldita se usa el mismo polimerizador y acelerador mencionados para el epón. En el caso la resina VCD, el polimerizador es el anhídrido nonenil succínico (NSA) y el acelerador el dimetilaminofenol (DMAE). Además se agrega un plastificador que puede ser el diglicidil eter de polipropilenglicol (DER 736) (Hopwood y Wilne, 1992). El material de inclusión se somete a la acción de calor para polimerizarse y adquirir ciertas condiciones de plasticidad y dureza.

Cuando se usa el medio de inclusión de Spurr, la deshidratación se efectúa con acetona y se

preincluye con mezclas graduales del medio Spurr y acetona.

El uso de metacrilato es un método alternativo para la inclusión. En este caso no se efectúa la deshidratación aquí mencionada ya que el tratamiento del material biológico con metacrilatos graduales deshidrata, al tiempo que se está preparando para la inclusión (Horabin y col., 1991)

La inclusión, según la finalidad del trabajo en el material vegetal, se efectuó en epón, Spurr o en glicol metacrilato.

EPÓN. Después de la deshidratación, el material se trató con tres cambios de óxido de propileno durante 20 minutos para luego preincluir en una mezcla de óxido de propileno y epón 50% durante 24 horas a temperatura ambiente. La inclusión se efectuó en una mezcla hecha con epón (5.07 gr), DDSA (3.7 gr), NMA (2.2 gr) y DMP (0.17 gr). La polimerización fue a 60 °C durante 24 horas.

SPURR. Después de la deshidratación, el material biológico se infiltró en medio de inclusión Spurr y acetona en las siguientes proporciones: 2, 4, 7, 12, 25, 40, 60, 80 y 100%. El tiempo en cada una fue de una hora. Después se dejó por 12 horas en medio Spurr recientemente preparado para luego polimerizar a 60 °C por 16 horas.

El medio de inclusión de Spurr se preparó mezclando 2.5 gr de vinil ciclohexano (VCD), 1.5 gr de diglicidil ether de polipropilenglicol (D.E.R. 736) y 6.5 gr de anhídrido noneil succínico. Esta mezcla se agitó durante un minuto y se le agregaron 8 gotas de dimetilaminoetanol (DMAE) con una pipeta de Pasteur. Se mezcló durante dos minutos con agitador. La cantidad final fue de 11 ml, suficientes para la pre-inclusión. Para la inclusión se preparó de nuevo el medio. La polimerización se efectuó durante 16 horas a 70 °C.

GLICOL METACRILATO. Después de la fijación se introdujeron los cortes en glicolmetacrilato (GMA) al 70, 80, 97%, durante 10 minutos en cada concentración. Posteriormente los cortes se pusieron en una mezcla de GMA y solución de inclusión no polimerizada (50%-50%) durante 20 minutos y luego prepólfmero durante un día. Se incluyó usando cápsulas de gelatina como recipiente y se sometió a luz ultravioleta para la polimerización.

E. Corte

El material biológico incluido en la resina se encuentra en condiciones de ser dividido en cortes lo suficientemente delgados para ser observados en el microscopio electrónico. Para esto primero hay que seleccionar el tejido que es objeto de estudio mediante la elaboración de una pirámide en la resina que lo contiene, desechando el material que rodea al tejido. Con el microtomo se hacen cortes semifinos (1 o 2 micras), se contrasta con azul de toluidina y se observan con el microscopio óptico para determinar la región en donde se encuentran las células que interesan. Posteriormente se hace una pirámide más pequeña que contenga a dichas células y se procede a hacer cortes de un grosor menor de 90 Å con el ultramicrotomo (Vázquez-Nin y Echeverría, 1983).

El ultra microtomo es un instrumento para cortar el material incluido en láminas lo suficientemente delgadas para ser observadas en el microscopio electrónico. El bloque en el que se a hecho la pirámide se sujeta a un brazo móvil del instrumento; éste, mecánicamente lleva el bloque hasta una cuchilla de vidrio o diamante. Junto al filo de la cuchilla hay agua en un recipiente hecho para tal propósito. El brazo móvil del ultra microtomo lleva el extremo de la pirámide al filo de la cuchilla y se efectúa el corte, este se desliza sobre la superficie del agua y se mantiene flotando. El brazo móvil retira el bloque de la cuchilla para efectuar un nuevo corte. Según se haya graduado el avance del brazo se puede obtener una hilera de cortes color dorado, plateado o gris, dependiendo de lo grueso del corte.

Los cortes semifinos se efectuaron en un ultramicrotomo Sorval MT-1. Se montaron en un portaobjetos y fueron teñidos con azul de toluidina para localizar la región más adecuada. Los

cortes ultrafinos de 60 a 90 nm se hicieron en un ultramicrotomo Sorval MT-2 y se montaron en una rejilla.

F. Contraste

Los cortes antes de ser observados en el microscopio electrónico deben de ser contrastados; para tal propósito, los cortes que flotan en el recipiente de la cuchilla se recogen con una rejilla de cobre manipulada con pinzas especiales. La rejilla se encuentran recubiertas en una de sus caras por una membrana de formvar. La cara que contiene la membrana es la que se pone en contacto con los cortes para que se adhieran. Los cortes montados en la rejilla se encuentran listos para ser contrastados (Vázquez-Nin y Echeverría, 1983).

El contraste consiste en obtener en las estructuras biológicas diferencias de densidades de átomos de elevado número atómico. Esto se logra aplicando a los cortes montados en un soporte, soluciones de sales de metales pesados que tengan afinidad por las moléculas orgánicas (Vázquez-Nin y Echeverría, 1983). Generalmente se hacen dos tratamientos sucesivos separados por lavados de agua destilada, en el primero se utiliza acetato de uranilo (Tandler, 1990) y después citrato de plomo.

Para contrastar los cortes se prepara una caja de Petri con un papel parafilm adherido en el fondo del recipiente. Sobre el parafilm se coloca una gota del contrastaste. Para mantener una atmósfera húmeda dentro de la caja se coloca un algodón empapado con agua. Cuando se desea evitar el bióxido de carbono (contraste con citrato de plomo) se coloca también un vidrio de reloj pequeño con hidróxido de sodio. En estas condiciones los cortes se ponen en contacto con el contrastaste, haciendo flotar la rejilla sobre una gota de éste, durante el tiempo necesario.

Después de que los cortes montados en la rejilla estuvieron en contacto con cada una de las sustancias de contraste, se lavan con unas 40 gotas de agua bidestilada y se secan poniendo una orilla de la rejilla en contacto con papel filtro.

Una vez efectuado el contraste se pasa a hacer la observación en el microscopio electrónico y

la obtención de las fotografías si así se desea.

EDTA. El contraste se hizo mediante la técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA). Se hicieron ensayos para obtener el tiempo adecuado para que el quelante ejerciera su acción, y se hizo la contrastación final con acetato de uranilo 5% (pH 4), EDTA y citrato de plomo 3%.

Después de que los cortes montados en la rejilla estuvieron en contacto con cada una de las sustancias contrastantes, se lavaron con aproximadamente 60 gotas de agua bidestilada y se secaron poniendo una orilla de la rejilla en contacto con papel filtro.

G. Fotografía

El material procesado para su observación se introduce al microscopio electrónico. Este es un instrumento que utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar la muestra y obtener una imagen de la misma en una pantalla fluorescente. Esta imagen puede obtenerse en negativos fotográficos a través de un dispositivo especial que contiene el instrumento.

H. Análisis de la imagen

Los microscopios electrónicos de transmisión tienen un poder de resolución entre 0.2 y 0.25 nm y un aumento variable, de algunas decenas a 500 000 como máximo. Para hacer más cómodo el estudio de la imagen, se amplía el negativo fotográfico obtenido en el microscopio electrónico (Vázquez-Nin y Echeverría, 1983).

El procedimiento general arriba descrito tiene en principio que adaptarse para obtener los mejores resultados según el material biológico utilizado, esto implica poner "a punto" la técnica, principalmente de fijación.

Las células vegetales poseen vacuolas y pared celular. Estos organelos influyen determinadamente en el procedimiento de fijación. La pared celular funciona como una barrera

que dificulta la penetración de las sustancias fijadoras hacia el protoplasma mientras que las vacuolas, por su alto contenido de agua, diluye a dichas sustancias. La variabilidad de la naturaleza de estas estructuras provoca que un procedimiento útil para cierto tejido, sea ineficaz en otro.

Como se puede apreciar, el método en sus primeros pasos consiste de una fijación química acuosa, seguida por deshidratación e inclusión en una resina hidrofóbica. Este proceso presenta desventajas para las plantas ya que provocan pérdida y/o dislocación de iones inorgánicos y otras sustancias solubles (Lehmann y col., 1991), por lo que la adecuación de la técnica para cada especie en particular requiere de ensayos con distintos fijadores, mezclas de los mismos en distintas proporciones, diferentes tiempos de fijación, distintas temperaturas, y uso de vacío durante la fijación.

De acuerdo con los niveles de evolución establecidos para las plantas actuales (ver fig 6) se ha seleccionado a *Ulva lactuca* como miembro de las algas verdes, a *Psilotum nudum* como representante de las primeras plantas terrestres, para los niveles intermedios entre los primeros vegetales terrestres y las plantas superiores se trabajaron a *Marattia laxa* (helecho) y *Ceratozamia mexicana* (Cicadácea) y entre las plantas superiores a *Taraxacum officinalis* (dicotiledonea) y *Zea mays* (monocotiledonea). A manera de testigo se tomo a *Allium cepa* (cebolla) por ser la planta más ampliamente estudiada en cuanto a núcleos se refiere.

A continuación se presenta el proceso particular utilizado en los trabajos experimentales de esta tesis en cada una de las plantas.

I. Procesos particulares

1. *Ulva lactuca*

La planta se colectó en la isla Sacrificios, localizada frente al Puerto de Veracruz. La fijación fue con una mezcla de formaldehído-glutaraldehído, se deshidrató con alcoholes graduales y se incluyó en epón.

El contraste se hizo mediante la técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas con acetato de uranilo 5% (PH 4) durante dos minutos, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 16 minutos y citrato de plomo 3% durante 3 minutos.

Algunos cortes se contrastaron con acetato de uranilo durante 20 minutos, después de secados se pusieron en citrato de plomo durante 10 minutos para hacer comparaciones con los resultados de la tinción regresiva de Bernhard.

Los núcleos de las células de *Ulva lactuca* fueron fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10 C. La imagen impresa en papel fotográfico fue de 16000 a 60000 aumentos.

2. *Ptilotum nudum*

La planta se colectó a la orilla de un río a cinco kilómetros, aproximadamente, al sureste del poblado de Zongolica, Veracruz.

La fijación fue con una mezcla de formaldehído-glutaraldehído, se deshidrató con alcoholes graduales y se incluyó en epón.

El contraste se hizo mediante la técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas. Acetato de uranilo 5% (PH 4) durante dos minutos, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 16 minutos y citrato de plomo 3% durante 3 minutos.

Los núcleos se fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 9. Las imágenes impresas en papel fotográfico fueron de 8800 a 65000 aumentos.

3. *Marattia laxa*

Para el procesamiento del helecho se utilizaron hojas de un ejemplar cultivado en el invernado de la UNAM.

La fijación fue con una mezcla de formaldehído-glutaraldehído, se deshidrató con alcoholes

graduales y se incluyó en epón. La contrastación se hizo con EDTA.

Las imágenes impresas fueron en 16 000 a 40 000 aumentos.

4. *Ceratozamia mexicana*

Las hojas de *Ceratozamia mexicana* se obtuvieron de un ejemplar del invernadero de la UNAM.

La hoja de esta cicadácea se fragmentó en pedazos menores a un milímetro cúbico en contacto con el fijador. La fijación se efectuó con una mezcla de paraformaldehído 3.4% y glutaraldehído 6.4% en partes iguales. Por cada 10 m de esta mezcla, se usó 4.5 m de piperazina N-N bis (ácido 2-etanol sulfónico) 0.08 M y 6.25 mg de cloruro de calcio como amortiguador. Antes, los fragmentos de hoja se sometieron durante 10 minutos a una reducción de la presión atmosférica mediante la formación de vacío. Se continuó con la fijación durante 24 horas a una temperatura de 4 °C.

El vacío se hizo en una desecadora adaptada con una manguera para extracción y otra para admisión de aire, ambas con válvula. A los viales (recipientes de cristal con rosca y tapadera de aproximadamente 5 m. de capacidad) que contenían el material biológico con el fijador, se les desenroscó su tapadera, de tal manera que sin estar totalmente cerrados, permitiera la extracción e introducción de los gases al interior del vial. La extracción de la atmósfera interna del desecador se hizo activando la bomba de vacío y cerrando muy lentamente la válvula de admisión. La acción de la válvula de vacío se suspende algunos segundos después de que aparecen burbujas en el fijador, en ese momento se cierra la válvula de admisión. El tiempo que debe pasar desde que se inicia la abertura hasta la recuperación de la presión atmosférica en el interior del desecador es de aproximadamente 60 seg. El tiempo total de operación no debe de exceder de 10 minutos.

La deshidratación se hizo con alcoholes graduales y la inclusión en epón.

En la contrastación se hicieron diversas combinaciones de tiempo: para acetato de uranilo, de

uno a cinco minutos; EDTA, de 16 minutos a dos horas y para citrato de plomo, tres minutos. Otro factor que varió fue el pH así como la temperatura del EDTA. Se probó con pH de 4 a 7 y temperatura de la ambiental hasta 60°C.

Las fotomicrografías del núcleo fueron tomadas en el microscopio electrónico Zeiss EM 10 C/. El aumento en el papel fotográfico fue de 8000 a 30000 aumentos.

Otro procedimiento usado en el estudio del núcleo de este vegetal fue el método de contrastación preferencial para la cromatina (Vázquez-Nin y col., 1973). Los cortes efectuados con el ultramicrotomo y montados en rejillas de material incluido en GMA, se contrastaron con una solución de ácido fosfotúngstico (PTA) 0.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron fotografías en el microscopio electrónico Zeiss EM 10 C/.

El aumento en el papel fotográfico fue de 8 000 a 30 000 aumentos.

Esta cicadácea fue sometida además al procedimiento de la reacción nuclear de Feulgen - Rossenbeck. Los cortes semifinos montados en un porta objetos se introdujeron en una caja de Coplin con ácido clorhídrico 5N durante 30 minutos. Se lavó con agua destilada y el portaobjetos se colocó en una caja de Petri sobre un pedazo de vidrio en uno de sus extremos, de forma tal que el porta objetos forma un ángulo de algunos 6° con el fondo de la caja de Petri. Los cortes, que deben quedar hacia abajo, son sometidos al reactivo de Shift agregándose con un gotero hasta llenar el espacio entre el portaobjetos y la caja de Petri. Posteriormente se coloca el portaobjetos en una caja de Coplin y se le agrega una mezcla, recién preparada, de K_2SO_4 , al 10% (5ml), HCL 1N (5 m) Y H_2O (90 m); el baño sulfuroso se hace tres veces. Finalmente se lava con agua destilada.

5. Taraxacum officinalis

Antes de desprender las hojas de la planta, la superficie fue fijada "in vivo" con paraformaldehído y glutaraldehído. Se llenó el espacio interior de un anillo metálico (de 12 mm de diámetro y 4 de grueso previamente adherido con lanolina a la superficie de la hoja) con los

fijadores mediante una jeringa hipodérmica y se tapó con un cubreobjetos. Después de 45 minutos, se cambió el líquido fijador en el anillo y así permaneció 45 minutos más. Se cortó la zona afectada por el fijador dentro del anillo, y los fragmentos se pasaron a la mezcla fijadora recientemente preparada. Se mantuvieron en ella durante 16 horas a 4 °C de temperatura.

La deshidratación se hizo con alcoholes graduales, la inclusión en epón y el contraste con uranilo 2%, EDTA y citrato de plomo durante 2, 20 y 3 minutos respectivamente. Otros cortes se contrastaron con acetato de uranilo durante 20 minutos y citrato de plomo 10 minutos.

Las imágenes fotográficas tuvieron un aumento final de 16000 a 47000 aumentos y se obtuvieron mediante un microscopio electrónico Zeiss EM9.

6. *Allium cepa*

La zona de diferenciación de la raíz de la cebolla se fragmentó en pedazos menores a un milímetro cúbico en contacto con el fijador. La fijación se efectuó con una mezcla de paraformadehído y glutaraldehído. Se deshidrató con alcoholes graduales y se incluyó en epón. La contrastación se hizo con uranilo-plomo.

El aumento final en las imágenes fotografiadas fue de 16000 a 70000 aumentos.

7. *Zea mays*

Hojas de una planta de maíz recién germinada se fijaron en una mezcla de paraformadehído-glutaraldehído. La deshidratación se efectuó mediante alcoholes graduales. La inclusión se efectuó en una mezcla epóxica. El contraste se hizo con acetato de uranilo 5% (pH 4) durante dos minutos, EDTA 20 minutos y citrato de plomo 3% durante 3 minutos.

Se utilizó el microscopio electrónico EM 10 y las imágenes tuvieron de 19000 a 50000 aumentos.

8. Análisis cuantitativo

a. Diámetro mayor y menor del núcleo y nucleolo

El diámetro mayor y menor de los cortes de núcleos y nucleolos se determinaron de la siguiente manera:

En el caso de *Uva lactuca*, el volumen del núcleo y nucleolo se determinó usando las imágenes fotográficas obtenidas mediante el microscopio electrónico debido a lo pequeño de este organelo. Con esta excepción el procedimiento se efectuó de manera similar en todas las plantas estudiadas.

Se obtuvieron las dimensiones de las imágenes fotográficas en centímetros y se les multiplicó por 10^4 para transformar los centímetros a micras. El resultado se dividió entre el aumento total de la imagen para obtener las dimensiones reales.

$$D = \frac{I \cdot 10^4}{A}$$

D = Diámetro, en micras, del núcleo o nucleolo

I = Diámetro, en centímetros, de la imagen fotográfica del núcleo o nucleolo.

A = Aumento total de la imagen.

b. Área nuclear y nucleolar

El área nuclear y nucleolar se determinaron en la imagen fotográfica mediante un planímetro. Los valores obtenidos en centímetros cuadrados se multiplicaron por 10^8 para transformar los centímetros cuadrados en micras cuadradas. El valor obtenido se dividió entre el cuadrado del aumento total, según la fórmula:

$$A = \frac{I}{L^2}$$

A = Área nuclear o nucleolar
I = Área en micras cuadradas
L = Aumento total

c. Volumen nuclear y nucleolar

Los volúmenes de núcleos y nucleolos se calcularon con los datos obtenidos al hacer las mediciones en preparaciones hechas para microscopia de luz. Cortes semifinos teñidos con azul de toluina fueron utilizados para medir la longitud mayor y menor mediante un micrómetro ocular (Casartelli 1974). Para calibrar el sistema óptico se dispone el microscopio de tal manera que se superponen dos escalas, la del ocular y un portaobjetos con marcas cada 10 micras y se cuenta el número de líneas que están grabadas sobre un portaobjetos que coincide con las del ocular.

El volumen se calculó con las medidas del diámetro mayor y el diámetro menor en micrómetros, mediante la fórmula:

$$V = 4/3 \text{ Pi } (D/2)(d/2)^2$$

$$\text{Pi} = 3.1416$$

D = Diámetro mayor en micrómetros

d = Diámetro menor en micrómetros

d. Diámetro de los granos pericromatinianos e intercromatinianos

Los granos pericromatinianos e intercromatinianos se miden con un Vernier en las imágenes fotográficas. Los valores obtenidos en milímetros son transformados a Angstroms mediante la

siguiente fórmula:

$$D = \frac{d \cdot 10^7}{A}$$

D = Diámetro en Å de los GPC y GIC

d = Diámetro en mm de la imagen
fotográfica de los GPC y GIC

A = Aumento total de la imagen

IV. RESULTADOS

A. *Ulva lactuca*

El cuerpo folioso de *Ulva lactuca* está formado por dos capas de células alargadas. La pared celular de estas, es considerablemente gruesa y cada célula contiene una vacuola que ocupa casi por completo el contenido celular.

Los organelos de las células de *Ulva lactuca*, incluyendo al núcleo, se encuentran en el extremo más próximo a la superficie del cuerpo de la planta.

En esta alga, el promedio obtenido para el diámetro mayor y menor de los núcleos estudiados es de 2.4μ y 1.42μ respectivamente. El volumen calculado es de $2.95 \mu^3$. Como se puede apreciar en la figura 14, este núcleo es el más pequeño de las plantas estudiadas.

La distribución de la cromatina no es reticular ni típicamente cromocéntrica pero tiende a esta última (fig. 7a).

En los núcleos de *Ulva lactuca* no se observó más de un nucleolo por célula, algunos cortes no lo mostraban. El nucleolo se sitúa generalmente en el centro del núcleo o hacia el extremo del diámetro mayor. Su aspecto es generalmente granuloso pero en algunos se pueden distinguir sus regiones características: centros fibrilares, región fibrilar densa y la región granular (figura 7a).

El promedio del diámetro mayor del nucleolo es de 0.873μ y su diámetro menor de 0.71μ . Su volumen promedio es de $0.242 \mu^3$ (figura 15).

De las estructuras ribonucleoproteicas, además del nucleolo, se observaron fibras, escasos granos pericromatinianos y granos intercromatinianos (figura 7a y 7b). Los granos pericromatinianos miden en promedio 350 \AA con halo, y sin él 175.9 \AA (figura 16).

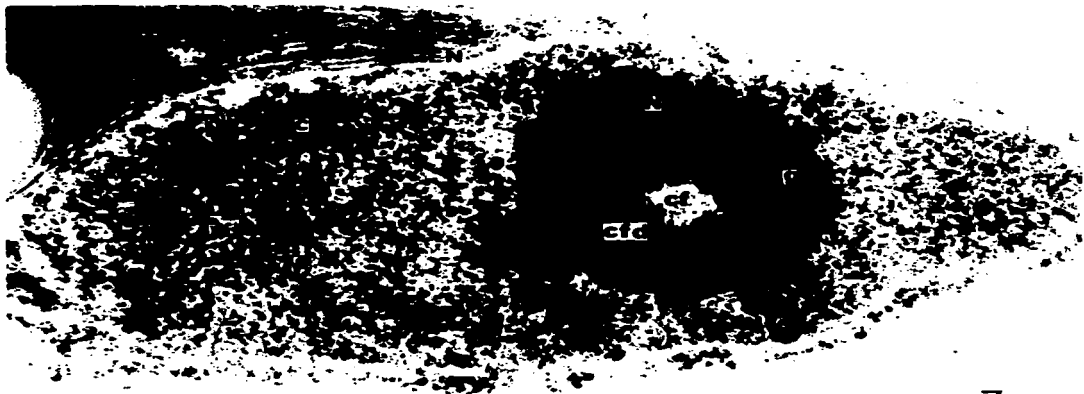
Además de las estructuras típicas de los núcleos se observaron zonas claras con la tinción uranilo-plomo, en regiones cercanas o anexas a la membrana nuclear que corresponden, probablemente, a retracciones de la propia membrana nuclear

Fig. 7a. Micrografía electrónica que muestra la estructura de un núcleo de *Uva lactuca* teñido con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se observa la envoltura nuclear (EN); abundante material fibrogranular; cromatina (C); y el nucleolo. El nucleolo es esferoidal (N), se observa: el centro fibrilar (cf), componente fibrilar denso (cfd) y componente granular (g).

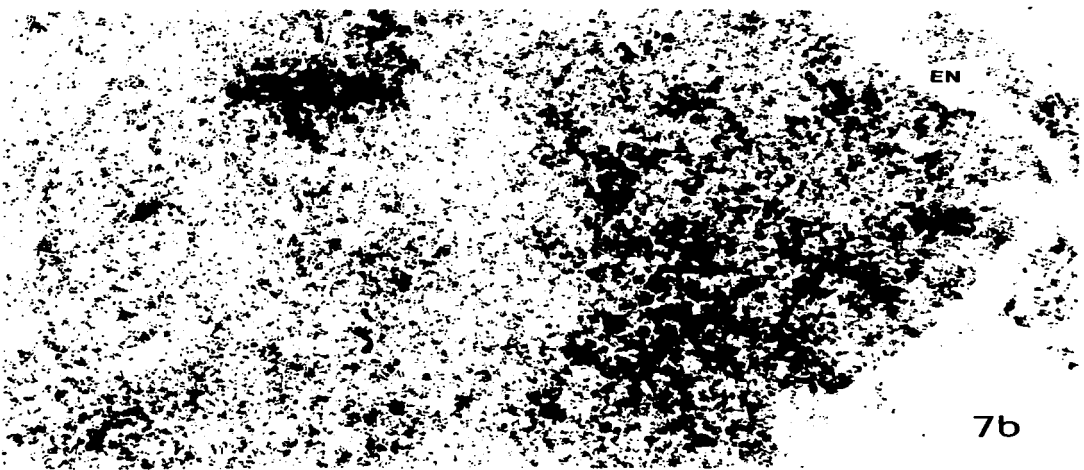
Aumento 102,000 X.

Fig. 7b. Porción del núcleo de *Uva lactuca* teñido con acetato de uranilo-citrato de plomo en donde se muestra el abundante material fibroso granular que existe en todo el núcleo. La flecha señala a un grano pericromatiniano. Se observa cromatina compacta (C) y una parte de la membrana nuclear (EN).

Aumento 157,000 X.



7a



7b

B. *Psilotum nudum*

Los núcleos de *Psilotum nudum* son generalmente ovalados con un promedio de su diámetro mayor de 15.66μ y 10.84μ de diámetro menor. El volumen es de $762.2 \mu^3$ en promedio (figura 14). En algunos casos los núcleos son casi circulares, mientras que en otros se aprecian notablemente alargados. Las imágenes circulares podrían ser de cortes transversales de núcleos ovalados; sin embargo, las características que presentan indican la posibilidad de que sean dos tipos diferentes de núcleos.

En los núcleos esféricos tratados con EDTA, la cromatina en la periferia del núcleo se ve clara, de tal manera que es posible discriminar las partículas ribonucleoproteicas sin dificultad; en cambio, los grumos de cromatina más alejados de la membrana nuclear no se descolorean (figura 8a). Entre los grumos más internos de cromatina, parece haber comunicación mediante material de aspecto fibroso. En la figura 8b se muestra dicho material entre los grumos de heterocromatina.

Los núcleos alargados también tienen aspecto reticular con material fibrogranular intercromatiniano, el cual es más notable que en los núcleos redondos. La heterocromatina se blanquea con EDTA uniformemente en los núcleos alargados, y los grumos son más voluminosos que en los núcleos esféricos.

Los nucleolos se ven con poca frecuencia en las fotografías debido, probablemente, a su tamaño relativamente pequeño con relación a la totalidad del núcleo (figura 8a). Tienen un volumen promedio de $2.69 \mu^3$ (figura 15) y se localizan generalmente en la periferia del núcleo. En su mayoría son compactos y con cromatina asociada. Un halo claro alrededor del nucleolo se observa, tanto en los cortes semifinos contrastados con azul de toluidina, como en las electromicrografías obtenidas con la técnica del EDTA.

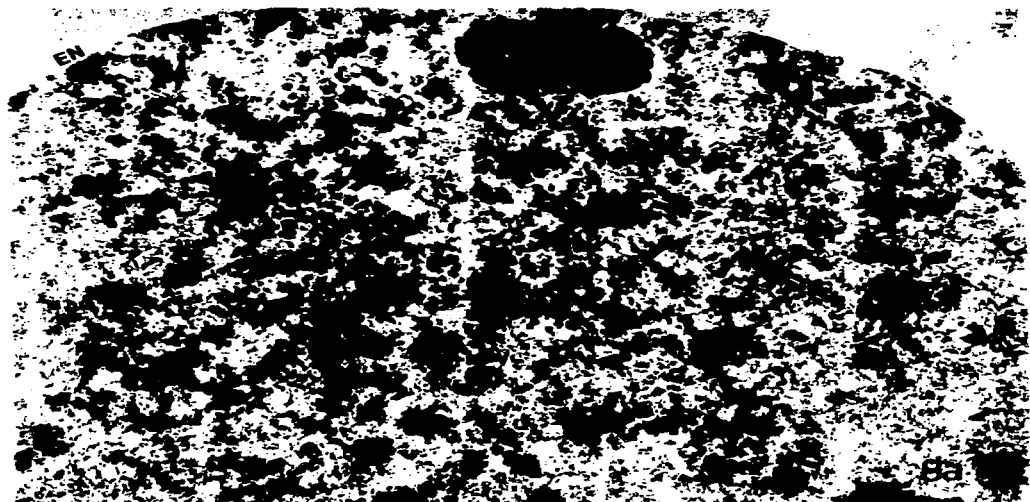
Entre las estructuras ribonucleoproteicas conocidas se encontraron fibras pericromatinianas, granos pericromatinianos y granos intercromatinianos (figura 8a y 8b). Los granos pericromatinianos tienen un diámetro de 432 \AA sin halo, con él alcanzan 976.6 \AA en promedio (figura 16). Su densidad numérica, en las fotografías estudiadas es de $0.75 \text{ gpc/micra cuadrada}$.

Fig. 8a. Núcleo reticulado de *Psilonyx nudus* contrastado con EDTA. Se distingue la cromatina perinuclear (cp) que se decolora mediante la técnica de EDTA mientras que la cromatina interna no está del todo blanqueada (c). El nucleolo muestra a la cromatina asociada (ca). Se observan granos pericromatinianos (→▶), fibras pericromatinianas (→) y granos intercromatinianos (gi).

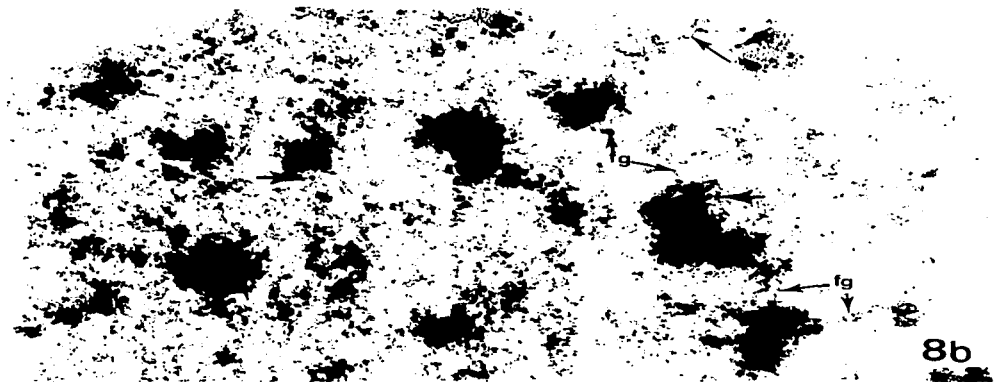
Aumento 14,900 X.

Fig. 8b. Núcleo de *Psilonyx nudus* contrastado con EDTA. Cerca de los grupos de cromatina se observan las fibras pericromatinianas (→). Entre los cúmulos de cromatina se encuentra un material fibrogranular (fg). También se observan los granos pericromatinianos (→▶).

Aumento 29,920 X.



8a



8b

C. Marattia laxa

Los núcleos seleccionados para este estudio fueron los de las células parenquimatosas que constituyen el mesófilo de la hoja de este helecho. El citoplasma se observa rodeando a una gran vacuola central. Las mitocondrias, cloroplastos y el núcleo se distribuyen formando una fila a lo largo de la membrana nuclear, entre esta y el tonoplasto de la vacuola.

Marattia laxa presenta un núcleo con un promedio en su diámetro mayor de 8.27μ y un diámetro menor de 5.05μ . El volumen calculado es de $120.0 \mu^3$ (figura 14).

En los núcleos de esta planta, la cromatina generalmente se encuentra distribuida reticularmente y en algunos casos los grumos de cromatina son grandes y abundantes (figura 9a). En otros, los grumos son laxos y menos voluminosos.

El nucleolo tiene un volumen de $2.46 \mu^3$ (figura 15). Se localiza más o menos en la parte central del núcleo, son en algunos casos laxos y en otros más compactos, estos últimos muchas veces acompañados de una zona clara que los rodea.

Entre las estructuras ribonucleoproteicas conocidas se encuentran fibras pericromatinianas, granos pericromatinianos y granos intercromatinianos aislados (figuras 9a y 9b).

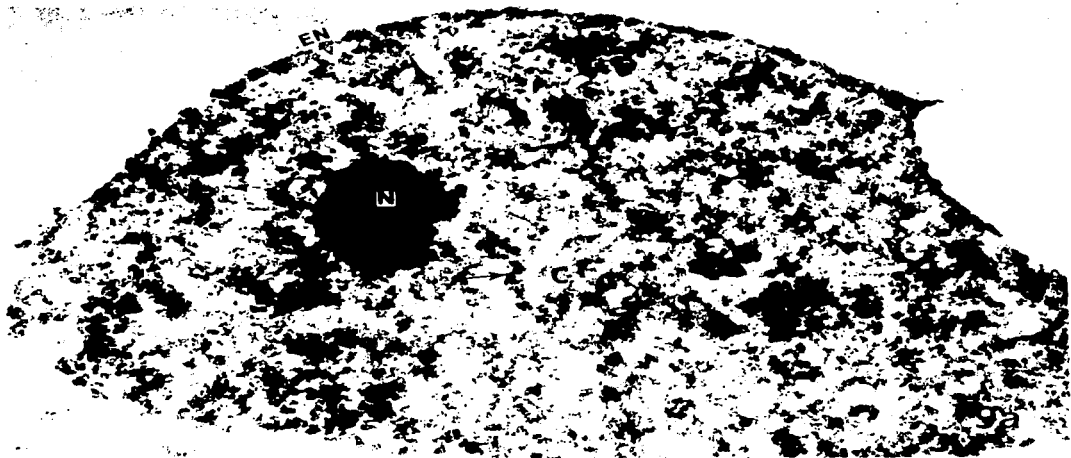
Las fibras tienen una localización peri e intercromatiniana. La cantidad de ellas es variable, en algunas imágenes son escasas. En los núcleos con grumos abundantes, las fibras son pericromatinianas; en los otros, las fibras intercromatinianas son abundantes y se distribuyen por toda la región intercromatiniana.

Los granos pericromatinianos con halo miden 730 \AA y sin él 349 \AA (figura 16). Su densidad numérica se calculó en 2.11 granos pericromatinianos por micra cuadrada (figura 16).

Se observaron granos semejantes a los pericromatinianos en pares y formando cadenas. Las cadenas de granos semejantes a los pericromatinianos son de número y longitud variable.

Fig. 9a. Micrografía electrónica de un núcleo reticulado de *Marattia laxa* contrastado con EDTA. Se observa la envoltura nuclear (EN), un nucleolo compacto (N), cromatina compacta (C), fibras pericromatinianas (—>) y granos pericromatinianos (<—>). Aumento 18,480 X.

Fig. 9b. Núcleo reticulado de *Marattia laxa* contrastado con EDTA. Se observan grumos de cromatina compacta (C), abundantes granos intercromatinianos dispersos (gi), fibras pericromatinianas (—>) y granos pericromatinianos (<—>). Aumento 26,400 X.



D. *Ceratocarpus mexicana*

Las hojas de *Ceratocarpus mexicana* poseen una gruesa capa de cutina, una capa de células de parénquima en empalizada, un tejido de parénquima esponjoso con abundantes espacios aéreos y el tejido conductor bien definido.

En el tejido parenquimatoso de la planta no se obtuvo el perfil de EDTA; no obstante haber utilizado diferentes tiempos para el quelante (16,18,20,25,30,35,60, y 120 minutos), así como diferentes temperaturas y pHs. Los grumos se han considerado de naturaleza cromatiniana ya que se colorean de rojo magenta con el reactivo de Schiff. La distribución de estos grumos es más o menos regular y se conectan entre sí mediante fibras (figuras 10a y 10b).

Los núcleos observados de *Ceratocarpus mexicana* son ovalados y en algunos casos con extremos muy delgados. Su diámetro mayor es de 13.78μ y el diámetro menor de 6.49μ . El volumen de $324.3 \mu^3$ (figura 14).

El nucleolo se encuentra asociado por un extremo a la cromatina, así lo demuestran las fotografías de tejido procesado mediante la técnica de PTA. La región del nucleolo que no está asociada a cromatina, aparece rodeada por un halo claro (figura 10a). Los nucleolos en su mayoría aparecen compactos, otros presentan una estructura laxa o nucleolonemal (figura 10b). Se observaron cuerpos nucleares que pueden corresponder a cuerpos espiralados. Los cuerpos nucleares se presentan como estructuras redondas, densas y con una región clara que los rodea (figura 10a)

Los granos pericromatinianos con halo miden en promedio 915 \AA , y sin él 438 \AA (figura 16). Su densidad se calculó en 0.51 granos por micrómetro cuadrado (figura 16). Se observaron granos pericromatinianos solos y en pares.

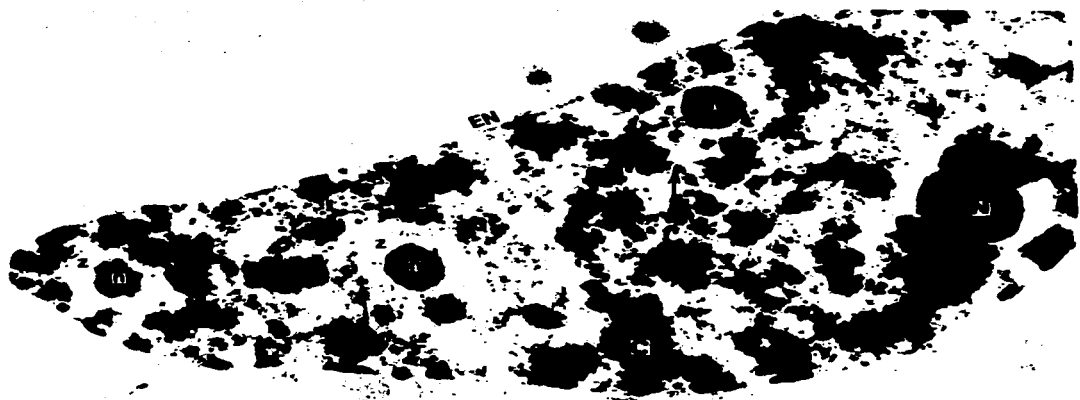
Se observaron fibras, probablemente ribonucleoproteicas, su distribución es generalmente intercromatiniana, aunque también hay fibras pericromatinianas.

Fig. 10a. Núcleo reticulado de *Ceratozamia mexicana* con un nucleolo (N), cromatina compacta (C), fibras pericromatinianas (←→), granos pericromatiniano (→→) y cuerpos nucleares que podrían corresponder a cuerpos espiralados (n) con una zona perinucleolar transparente a los electrones (z).

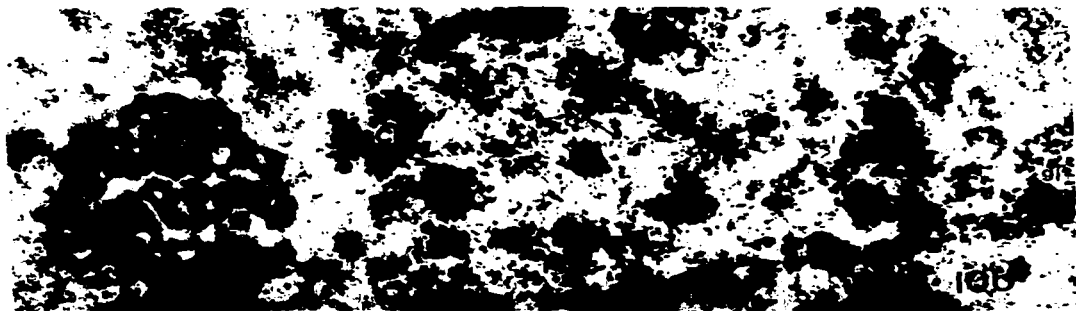
Aumento 11,900 X.

Fig. 10b. Núcleo de *Ceratozamia mexicana* en donde se observa un nucleolo laxo (N), fibras pericromatinianas (←→), granos pericromatinianas (→→) y granos intercromatinianos (gi).

Aumento 26,840 X.



10 a



10 b

E. Taraxacum officinalis

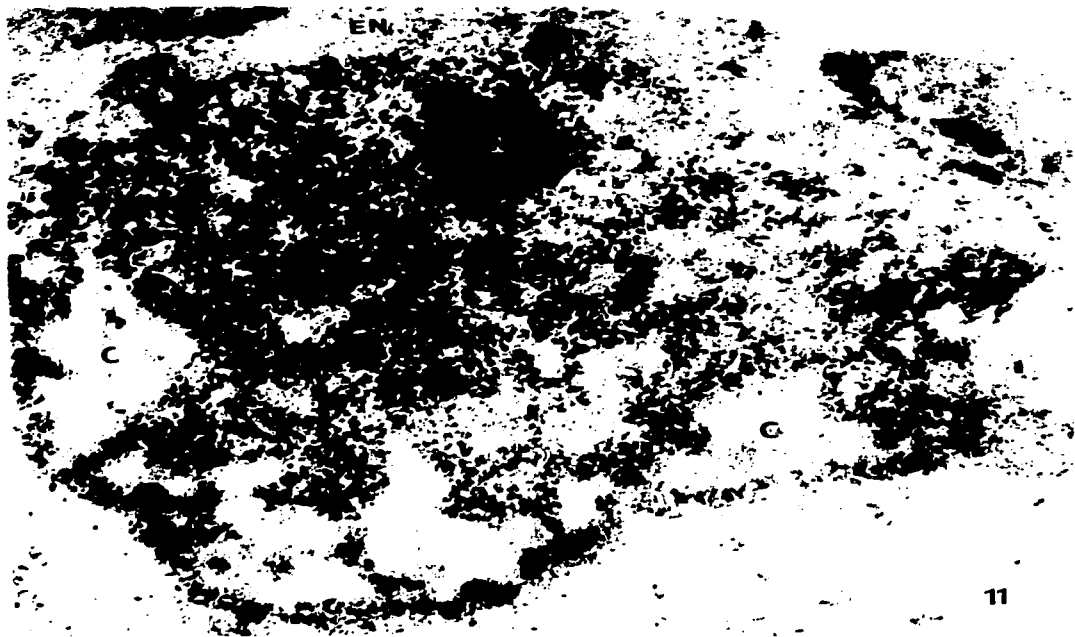
Los núcleos de las células parenquimatosas de las hojas de *Taraxacum officinalis* son generalmente ovalados. El diámetro mayor se calculó en 4.7μ y el menor en 2.29μ . Su volumen promedio es de $11.22 \mu^3$ (figura 14).

La cromatina se presenta en grandes grumos, por lo general se distribuye perinuclearmente. Los grumos localizados más internamente en el núcleo son poco abundantes y de menor tamaño (figura 11).

El nucleolo es de apariencia granulosa y en uno de ellos se observa una región fibrosa. No se observó en todos los cortes debido probablemente a su tamaño relativamente pequeño. El volumen nucleolar es de $0.5 \mu^3$ (fig 15).

Entre las estructuras ribonucleoproteicas se localizaron granos pericromatinianos fibras pericromatinianas y fibras intercromatiniana. Los granos pericromatinianos con halo miden en promedio 616 \AA y sin halo 247 \AA (figura 16). Su densidad numérica fue de 4.8 granos por micrómetro cuadrado (figura 16).

Se observaron granos semejantes a los pericromatinianos formando cadena o en pares que comparten su halo.



11

Fig. 11. Núcleo de *Taraxacum officinalis*. En la micrografía se muestra la envoltura nuclear (EN), cromatina descolorada con la técnica del EDTA (C) y un nucleolo compacto (N). También se observan granos pericromatinianos (↔), granos intercromatinianos (gi) y fibras pericromatinianas (→).

Aumento 360,000

F. *Zea mays*

En las células parenquimatosas de hojas jóvenes del maíz se observaron dos tipos de núcleos; unos reticulados con grumos de cromatina relativamente escasos, nucleolos pequeños y compactos. El otro tipo de núcleos se observó con grumos de cromatina generalmente grandes dispuestos perinuclear e internuclearmente. El primer tipo de núcleos no blanquearon su cromatina al tratarlos en la técnica de Bernhard, utilizando los tiempos de 2 minutos para el acetato de uranilo, 20 minutos para el EDTA y tres minutos para el citrato de plomo. En el segundo tipo la cromatina sí fue blanqueada con la técnica de Bernhard en los tiempos mencionados, razón por la cual en estos se efectuó el estudio de las estructuras nucleares.

En este vegetal los núcleos estudiados son alargados. Su diámetro mayor es de 14.39μ y su diámetro menor de 6.73μ . Su volumen es de $394.7 \mu^3$ (figura 14).

El promedio del volumen del nucleolo es de $1.89 \mu^3$ (figura 15). Por lo general los nucleolos se encuentran asociados a un grumo de cromatina y en algunas de las microfotografías se observa una estructura fibrilar más o menos continua, que va desde el nucleolo hasta la matriz nuclear por el interior de un grumo de cromatina (figura 12b).

De las partículas ribonucleoproteicas además de los nucleolos se observaron granos pericromatinianos, fibras pericromatinianas, fibras intercromatinianas y granos intercromatinianos. Los granos pericromatinianos con halo miden en promedio 930 \AA y 462 \AA sin él. La densidad numérica es de 7.12 granos por micra cuadrada. También se observaron granos semejantes a los pericromatinianos en pares, que aparentemente comparten su halo.

Fig. 12a. Núcleo de *Zea mays* contrastado con EDTA. En la micrografía se observa la cromatina reticular, fibras pericromatinianas (→), granos intercromatinianos (gi) y granos pericromatinianos (→).

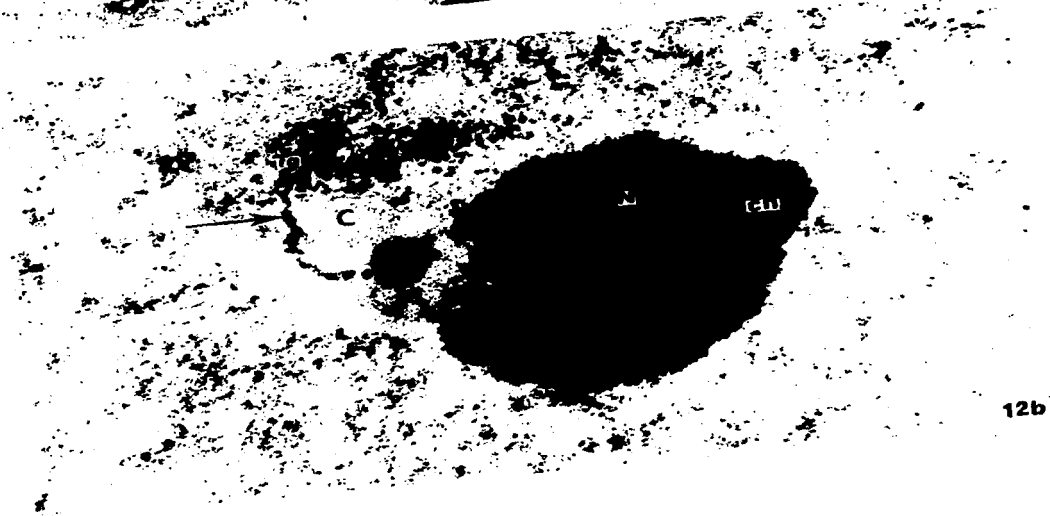
Aumento 33,000 X.

Fig. 12b. Núcleo de maíz contrastado con EDTA en el que se observan estructuras fibrosas de naturaleza ribonucleoproteica (→) que, a través de un grumo de cromatina, va del nucleolo (N) a una región granulosa (rg). Al lado derecho del nucleolo se distingue un cuerpo nucleolar (cn).

Aumento 49,600 X.



12a



12b

G. *Allium cepa*

Los núcleos de *Allium cepa* (cebolla) estudiados pertenecen a la zona de diferenciación de su raíz, la pared celular apenas se distingue en el microscopio óptico, sus vacuolas son pequeñas y un núcleo, localizado centralmente, es relativamente grande.

Los núcleos de cebolla son reticulados con abundante cromatina. Su diámetro mayor mide en promedio 10.8μ y el diámetro menor 8.24μ . El volumen nuclear es de $441.4 \mu^3$ (figura 14).

Se encontraron núcleos con uno y dos nucleolos. Su apariencia varía, hay nucleolos granuloso con una región más o menos central electrón-transparente, nucleolos en donde se distingue una región fibrosa y otra granulosa, y nucleolos predominantemente fibrosos. El diámetro mayor del nucleolo es de 4.14μ y su diámetro menor de 2.68μ en promedio. El volumen es de 14.57 (figura 15).

De las partículas ribonucleoproteicas se encontraron: granos pericromatinianos, granos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, fibras intercromatinianas y granos semejantes a los pericromatinianos que comparten su halo.

Los granos pericromatinianos miden en promedio 788 \AA con halo y sin él 321 \AA . Su densidad numérica es de 7.12 granos por micra cuadrada (figura 16).

En algunas microfotografías se observan cuerpos nucleares que podrían corresponder a cuerpos espiralados (figura 13b). Los cuerpos nucleares tienen un diámetro promedio de 0.68μ .

Fig. 13a. Núcleo de célula meristemática de la raíz de cebolla. En la micrografía se muestra un nucleolo (N) con centros fibrilares (f), componente fibrilar denso (d) y componente granular (g). Se observan fibras pericromatinianas (→), y granos pericromatinianos (→).

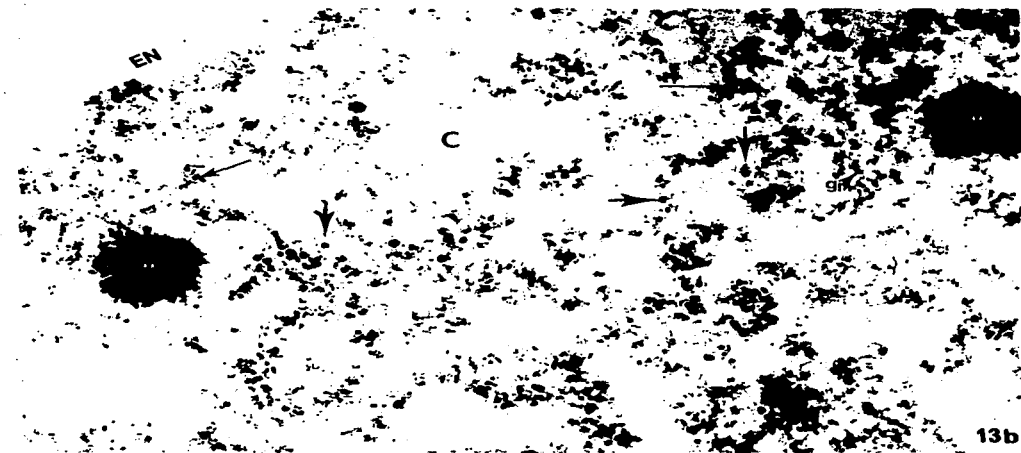
Aumento 17,000 X.

Fig. 13b. Núcleo de raíz de cebolla en donde se observan cuerpos nucleares que podrían corresponder a cuerpos espiralados (m), granos pericromatinianos (→), granos intercromatinianos (gi), y fibras (→).

Aumento. 89,300 X.



13a



13b

**VOLUMEN DEL NÚCLEO
EN LAS PLANTAS ESTUDIADAS
(EN MICRAS CÚBICAS)**

PLANTA	V	s	n
1 ULVA LACTUCA	2,95	1,76	16
2 PSILLOTUM NUDUM	762,2	412,7	31
3 MARATTIA LAXA	120	82,1	30
4 CERATUZAMIA MEXICANA	324,3	191,5	36
5 TARAXACUM OFFICINALIS	11,22	10,6	49
6 ZEA MAYS	394,7	271,7	49
7 ALLIUM CEPA	441,43	272,5	40

V= Volumen
s= Desviación estándar
n= Número de núcleos
medidos

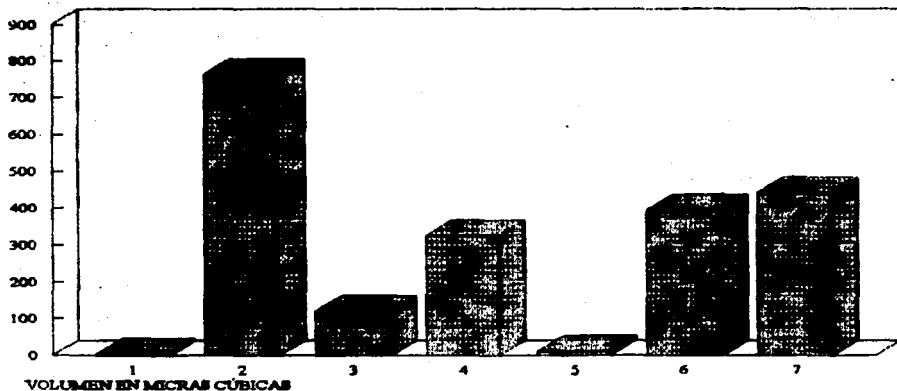


Fig. 14

**VOLUMEN DEL NUCLEOLO
EN LAS PLANTAS ESTUDIADAS
(EN MICRAS CÚBICAS)**

PLANTA	V	s	n
1 ULVA LACTUCA	0,242	0,068	16
2 PSILOTUM NUDUM	2,69	1,92	28
3 MARATTIA LAXA	2,48	1,59	31
4 CERATIZAMIA MEXICANA	0,946	0,081	30
5 TARAXACUM OFFICINALIS	0,5	0,072	28
6 ZEA MAYS	1,89	1,32	28
7 ALLIUM CEPA	14,67	11,23	28

V= Volumen
s= desviación estándar
n= Número de nucleolos
medidos

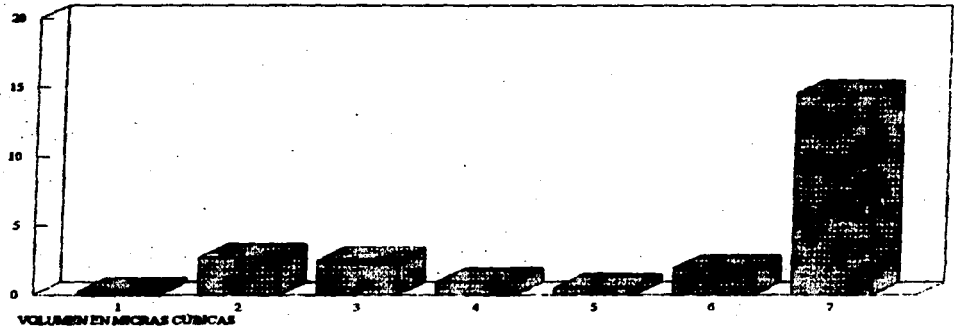


Fig.15

**DIÁMETRO DE LOS GRANOS PERICROMATINIANOS
SIN Y CON HALO (EN ANGSTROM) Y DENSIDAD
NUMÉRICA (D.N.) DE LOS GRANOS (EN GPC POR
MICRA CUADRADA)**

PLANTA	SIN HALO	CON HALO	D.N.
1 ULVA LACTUCA	175,9	350	muy escasos
2 PSILLOTUM NUDUM	432	976,6	0,75
3 MARATTIA LAXA	349	730	2,11
4 CERATIZAMIA MEXICANA	438	915	0,51
5 TARAXACUM OFFICINALIS	247	616	4,8
6 ZEA MAYS	462	930	7,12
7 ALLIUM CEPA	321	788	7,12

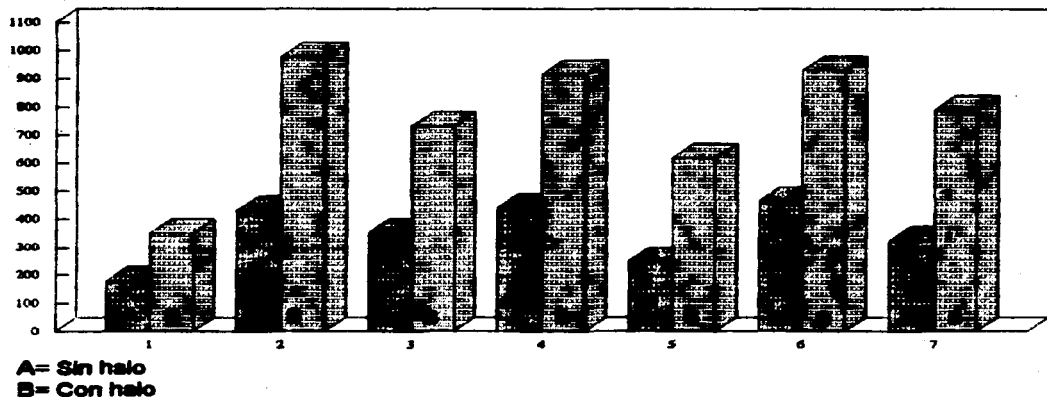


Fig. 16

V. DISCUSIÓN

Se han efectuado estudios del núcleo interfásico con enfoque evolutivo en protozoarios (Elizundia-Alvarez, J. M., 1985; Echeverría y col., 1993) y en animales (Jiménez-García, L.F., 1985). Entre los diferentes grupos de protozoarios se ha encontrado una gran diversidad en la ultraestructura de sus núcleos interfásicos. Por el contrario, entre los grupos del Reino Animal se ha encontrado que presentan un patrón estructural común para el procesamiento postranscripcional del pre-ARNm y del pre-ARNr, sugiriendo un origen común a partir de un ancestro procarionte relacionado con los órdenes de Cryptomonadida y Kinetoplastida.

De acuerdo con la hipótesis sobre el origen de los eucariontes (ver páginas 7-13 de esta tesis), las células vegetales y animales tienen un origen muy relacionado y se derivan de organismos en los que se efectuaron procesos de compartimentalización. Los estudios del núcleo interfásico con enfoque evolutivo de protozoarios y animales concuerdan con estas hipótesis. Asimismo los resultados aquí expuestos de los estudios sobre la estructura del núcleo interfásico en plantas pertenecientes a grupos de diferentes niveles evolutivos, complementan las investigaciones efectuadas en protozoarios y en animales. Esto permite ampliar el conocimiento sobre las características morfológicas del núcleo interfásico y sus relaciones evolutivas en tres de los reinos que conforman a los eucariontes.

La técnica regresiva de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969) ha mostrado ser útil para discriminar los componentes ribonucleoproteicos de la cromatina en la mayoría de las plantas utilizadas. Las diferencias del tiempo requerido para lograr el contraste podrían atribuirse al grosor de los cortes, pero los resultados negativos en cicadácea y la manera de cómo se contrasta la cromatina adosada a la membrana nuclear, mas no el resto de la cromatina en *Psilotum nudum* (ver figura 8a), hacen pensar que la decoloración está fundamentalmente dada por diferencias en la composición química de la cromatina.

Las células utilizadas para este trabajo, excluyendo a las de *Allium cepa*, fueron de tejidos

parenquimatosos. Estas células poseen una gran vacuola central que ocupa casi la totalidad de la célula, de tal forma que el contenido protoplasmático se observa desplazado hacia la periferia. Es probable que la presión de la membrana de la vacuola contra la pared celular sea un factor importante que determine la forma alargada que en general tienen los núcleos del tejido parenquimatoso de las plantas; no obstante, los núcleos de cebolla estudiados, que por ser de naturaleza meristemática no poseen la gran vacuola central, son también alargados (fig. 13 A).

Los volúmenes de los núcleos presentan una gran variabilidad, el núcleo con un menor volumen corresponde a *Ulva lactuca*, con sólo 2.95 micras cúbicas en promedio y el más grande corresponde a *Psilotum nudum* con 762.2 micras cúbicas en promedio. Esto podría indicar que el nivel evolutivo de las plantas no es un factor que influya en el volumen nuclear, ya que siendo vegetales evolutivamente muy cercanos están en los extremos de los valores del volumen nuclear. Esto se refuerza al observar el volumen de *Taraxacum officinalis* que, siendo un miembro de las plantas superiores, tiene un volumen casi tan pequeño como *Ulva lactuca* (fig. 14). El volumen nuclear podría corresponder más a la idea de que en organismos superiores el aumento en la talla celular está relacionado con un aumento en la talla nuclear (Nicholas, N.L., 1970), para hacer esta afirmación en vegetales habría que hacer un estudio que relacione el volumen celular y el volumen nuclear.

Llama la atención el tamaño tan pequeño de *Ulva lactuca*. Su volumen es casi igual al volumen del nucleolo de *Psilotum nudum* (compárese en las gráficas de las figuras 14 y 15); en tanto que, la estructura conserva la morfología básica de los núcleos en interfase.

En relación con la estructura, las células vegetales en interfase presentan una envoltura nuclear de doble membrana con complejos de poro, una matriz nuclear, cromatina compacta y laxa, nucleolo y estructuras ribonucleoproteicas peri e intercromatinianas (ver páginas 36-38 de esta tesis). Estas estructuras pueden considerarse como básicas en todo núcleo interfásico de las células animales (Monneron y Bernhard, 1968; Jiménez-García y col., 1979), y de acuerdo con

los resultados de este trabajo de tesis, podemos decir que son estructuras básicas encontradas también en los núcleos de las células vegetales, dado que están presentes en todas las especies de diferentes niveles evolutivos elegidos para este estudio.

En la literatura revisada no se encontraron estudios dirigidos a las particularidades de la envoltura nuclear de los vegetales, pero sí de las otras estructuras básicas mencionadas; además, se han encontrado características que no han sido descritas en núcleos animales como son los micropufa, cariosomas, cuerpos intranucleares argirófilos, cuerpos sueltos (en Moreno Díaz de la Espina y col., 1982) y los granos de Lacandonia (Jiménez García y col., 1992).

La organización de la matriz nuclear estudiada en vegetales presenta una organización similar a la encontrada en los animales tratados en condiciones similares (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991). En ellas encontramos los tres componentes básicos descritos anteriormente: el complejo de poro-lámina residual, la matriz interna y el nucleolo residual (ver páginas 42-48 de esta tesis).

En lo que se refiere a la cromatina, ésta adopta en los vegetales ciertos grados de condensación y distribución espacial de acuerdo a su contenido de ADN, volumen nuclear, longitud de los cromosomas y la proporción del genoma compuesto de secuencias repetitivas de ADN (Barlow, 1977; Mínguez y col., 1992). De acuerdo con el grado de condensación y distribución espacial encontramos núcleos eurreticulados, reticulados, semirreticulados y arreticulados en angiospermas. En el caso de las especies aquí estudiadas la mayoría posee núcleos eurreticulados, a excepción de *Ulva lactuca* que podría considerarse como un núcleo arreticulado y *Psilotum nudum* que es semirreticulado.

En las plantas terrestres que se incluyeron en este estudio existe una gran similitud en la disposición de su cromatina, a diferencia de los grupos del Reino Protista estudiados por Elizundia-Alvarez, J.E., (1985), en donde existen diferencias notables entre ellos, por ejemplo en los órdenes Dinoflagellida y Euglenoide la cromatina se encuentra condensada en los cromosomas interfásicos (Echeverría y col., 1993), en el orden Amoebida no existe cromatina

condensada, cromatina perinucleolar, ni cromatina adyacente a la membrana nuclear. Sobre estas dos últimas características se exceptúa al orden Cryptomonadida y Kinetoplastida. En cuanto a la cromatina en los animales, ésta forma grumos irregulares de heterocromatina en contacto con la envoltura nuclear y rodeando al nucleolo.

Comparando los resultados de este trabajo con los estudios efectuados en protistas y animales, encontramos similitudes con algunos protozoarios y en general, con los animales. No obstante, podemos decir que mientras los núcleos de las células animales son principalmente cromocéntricos (cromatina adherida a la membrana nuclear), en las células vegetales son mayoritariamente reticulados (cromatina formando una red tridimensional en el interior del núcleo).

Se sabe que los núcleos arreticulados y semirreticulados tienen un contenido 2 C ADN de 5 picogramos, mientras que los reticulados y eurreticulados tienen un contenido 2C ADN de más de 5 picogramos. La cantidad de ADN por unidad de volumen nuclear es más baja en núcleos arreticulados y semirreticulados. El espesor de las cromátidas en metafase, junto con el correspondiente volumen nuclear en interfase, pueden contribuir a un grado desproporcionado de dispersión en la cromatina de núcleos con bajo contenido de ADN nuclear. La proporción del genoma de secuencias repetidas de ADN puede jugar un rol en la determinación de la estructura de la cromatina en el núcleo interfásico (Barlow 1977). Dado que los grupos del nivel evolutivo más bajo como *Ulva* y *Psilorum* no poseen una clara reticulación, a diferencia de las plantas superiores en donde sus núcleos son evidentemente reticulados, es posible que a mayor nivel evolutivo el contenido de cromatina sea mayor.

En cuanto a las estructuras ribonucleicas estudiadas ampliamente en núcleos animales, como lo son el nucleolo, fibras pericromatinianas, granos pericromatinianos y los granos intercromatinianos (ver página 58-62 de esta tesis), han sido identificadas en las especies vegetales aquí estudiada. A continuación se hacen algunas precisiones de estas estructuras.

En los nucleolos de las células estudiadas se observaron los centros fibrilares, componente

fibrilar denso (figs. 7a y 13a), componente granular y región fibrogranular, pero también se observaron formas del nucleolo que no corresponden a la estructura típica descrita para este organelo en animales, en particular en *Psilotum nudum* y *Zea mays* (figs. 8a y 12b).

Se ha encontrado la presencia del nucleolo en todos los taxa de protistas, al igual que en los animales (a excepción del *Pelomyxopalustris*,) y ahora en los vegetales, confirmandose lo indispensable que es esta estructura para la síntesis y procesamiento del ARN-r. No obstante, este detalle no ha sido considerado en las teorías acerca del origen del núcleo (ver páginas 7-13 de esta tesis), pues al parecer las ventajas selectivas de la compartimentalización del material genético tuvo que involucrar la manera de mantener algunas relaciones fisiológicas y/o estructurales del material genético y el centro de síntesis y procesamiento del pre-ARNr.

Al parecer, tanto los protistas como los animales invertebrados carecen de las zonas o centros fibrilares y granulares, en el nucleolo, además de la forma nucleolonemale, características de los niveles evolutivos inferiores y los vertebrados. Sin embargo, en las plantas observamos estructuras del nucleolo típicas de animales superiores, en *Ulva lactuca* (fig. 7a) y en cebolla (fig. 13a), lo que indica que la fisiología, relacionada con la morfología del nucleolo, tiene un mecanismo similar en todos los niveles evolutivos de los vegetales y que las estructuras atípicas encontradas en este estudio puedan deberse a condiciones fisiológicas muy propias de las plantas estudiadas. Relacionado con esto veremos el caso de la cicadáceas.

En lo general, los nucleolos observados en cicadácea se observan compactos (fig. 10a), pero también se observan algunos nucleolos laxos o nucleolonemales (fig. 10b). En los vertebrados este tipo de estructuras nucleolares se dan en función de la actividad metabólica de las células. Un nucleolo laxo indica gran actividad en la elaboración de partículas pre-ribosomales que habrán de integrar la maquinaria de la síntesis de proteínas, lo que es contrario de un nucleolo compacto. La frecuencia de los nucleolos compactos en cicadáceas podría ser por el metabolismo "lento" de este tipo de plantas, al menos en lo que se refiere a la producción de materia orgánica utilizada en la estructuración de la materia que ayuda a su crecimiento, y tal vez a esto mismo responda la abundancia de estructuras semejantes a los cuerpos nucleares que se observan en la

figura 10a.

En lo que respecta a las fibras ribonucleoproteicas, podemos decir que se observaron en todas las especies aquí estudiadas. Se localizan en la periferia de la cromatina y en la región intercromatiniana, en algunas ocasiones formando cúmulos sólo de fibras y en otros casos asociadas con granos. A juzgar por la abundancia de las fibras, la transcripción y el procesamiento del ARNhn son muy activos en la región peri e intercromatiniana, esto concuerda con los resultados de Testillano y col. (1993), quienes han encontrado la presencia de SnRNP del spliceosoma, ADN y proteínas fosforiladas en la región intercromatiniana.

La abundancia de las fibras podría deberse a que las células son de tejido parenquimatoso, células con metabolismo activo debido a su actividad fotosintética. No obstante, llama la atención el tamaño relativamente pequeño del nucleolo, el cual, como ya se mencionó, produce los elementos ribosomales necesarios para la producción de proteínas.

Los granos pericromatinianos (GPC), al igual que las fibras, se observan en todas las plantas aquí estudiadas. El hecho de que estas estructuras se hayan observado también en la mayoría de los protistas y en los animales apoya la sugerencia de que estas estructuras representan en los eucariontes el sustrato morfológico en donde se almacena, transporta y procesa el ARNm (Vázquez-Nin y col., 1983; Echeverría y col., 1991).

Los GPC presentan, en estas plantas, un rango de 17.5 nm a 46.2 nm de diámetro. Los granos de menor tamaño corresponden a *Ulva lactuca* y el mayor a *Psilotum nudum*. Si se considera el tamaño del grano junto con su halo, *Ulva lactuca* alcanza un valor de 35 nm y *Psilotum nudum* 97.6 nm de diámetro en promedio. En general, las dimensiones del grano son del 40% al 50% con respecto a la estructura que incluye el halo.

Si tomamos en cuenta la relación existente entre las dimensiones de los núcleos de estas plantas y las comparamos con las dimensiones de los granos pericromatinianos (figs. 14 y 16), podemos observar que de cierta manera se corresponde al tamaño del núcleo con el diámetro de los GPC;

es decir, los núcleos de mayor tamaño poseen granos pericromatinianos más grandes que los que tienen núcleo más pequeño.

Por otra parte, en los granos pericromatinianos de los animales, por lo general, no hay diferencia significativa entre sus diámetros (Jiménez-García y col., 1989), en cambio, entre las plantas estudiadas se han encontrado diferencias significativas, (ver cuadro 16). De acuerdo con estos resultados, la variabilidad del tamaño de los GPC es mayor en los vegetales que en los animales. Esto mismo sucede con los protozoarios en donde la variabilidad y el diámetro promedio de lo GPC es similar al de las plantas (Jiménez-García y col., 1989). Se ha sugerido que las diferencias significativas entre protozoarios y animales pudieran deberse a diferencias cualitativas y/o cuantitativas en el procesamiento del ARN pre-m, sugerencia que puede ser válida también para las plantas, pero que habría que buscar alguna relación con el volumen nuclear dada la correspondencia que existe entre éste y el volumen del grano pericromatiniano.

Los granos intercromatinianos en las células animales aparecen en cúmulos entre los grumos de cromatina compacta y tienen un diámetro promedio de 20 a 25nm (Monneron y Bernhard, 1968). En los vegetales, además de granos con estas dimensiones, se han descrito otros más grandes que van de 30 a 40 nm (Medina y col., 1989) y los granos de lacandonia (Jiménez García y col., 1992).

Al igual que en los animales, los granos intercromatinianos de vegetales son las únicas estructuras (excepto para la cromatina) resistentes a la doble digestión prolongada con proteasa y RNasa (Puvion y Moyné, 1981). Los gránulos de 30-40 nm son resistentes tanto a la proteasa y digestión de RNasa, pero no a la combinación de ambas. Se ha reportado que, aunque los gránulos de 20-25 nm de los vegetales no forman grandes grupos, tienen una organización similar a los GIC, ya que se interconectan por delgadas fibras de 2-3 nm formando una red en el espacio intercromatiniano.

Principalmente los gránulos de 20-25 nm tienen una serie de características en común: tamaño y organización ultraestructural, presencia de una red, reacción positiva al EDTA y oxinitrato de

bismuto y contenido de proteínas altamente fosforiladas. Por estas razones se podrían considerar semejantes a los GI de animales. Sin embargo, los GI de vegetales presentan importantes diferencias en su organización topológica en el núcleo comparado con los GI animales, a saber, ellos nunca forman grandes grupos, pero aparecen distribuidos en pequeños grupos a través de la región intercromatiniana y también se localizan solitarios. Los grupos de gránulos de 40 nm podrían corresponder a grupos de gránulos pericromatinianos similares a los descritos en núcleos de plantas y animales (Medina y col., 1989).

Los granos intercromatinianos aquí observados son de los considerados como grandes e, incluso, en el caso de *Zea mays* el promedio de su diámetro es de 62.8 nm, que es mayor al encontrado en estudios previos.

Los resultados de este trabajo muestran que la ultraestructura de los núcleos celulares en interfase de los vegetales, es similar en todos los niveles evolutivos. También se ha encontrado gran similitud con los núcleos de las células animales, de acuerdo con los estudios de Jiménez-García (1985), no así con los protozoarios (Elizundia-Alvarez, J. M., 1985; Echeverría y col. 1993).

En los protistas existe una gran heterogeneidad en la ultraestructura del núcleo interfásico entre sus diferentes grupos, situación que se correlaciona con la propuesta de un origen polifilético de estos organismos. Dentro de esa heterogeneidad existen organismos cuya estructura nuclear es similar a los eucariontes pluricelulares, como en el caso de la ultraestructura del núcleo que presenta los órdenes de Cryptomonadida y Kinetoplastida, lo que ha permitido sugerir que estos órdenes tengan una cercana filogenética estructural con el (o los) ancestro(s) de las plantas y animales. Por otra parte, la similitud del núcleo vegetal y animal nos indica un origen común entre estos dos grandes grupos de seres vivos.

VI. CONCLUSIONES

Los núcleos interfásicos de las plantas pertenecientes a los distintos niveles evolutivos están constituidos por una envoltura, matriz nuclear, cromatina y estructuras ribonucleoproteicas. Estos elementos adoptan características cuantitativas y probablemente cualitativas, según el tipo de célula a la que pertenecen.

El volumen de los núcleos vegetales es muy variable, en las plantas estudiadas va de 2.95 a 441.43 μ^3 . Las dimensiones de estos núcleos no se corresponden con el grado de evolución de la planta a que pertenecen.

La cromatina en las células vegetales es generalmente reticulada, el grado de reticulación es menor en las plantas que pertenecen a niveles evolutivos inferiores como lo son *Ulva lactuca* y *Psilotum nudum*, y mayor en los núcleos de plantas con un nivel evolutivos superior.

En el volumen de los nucleolos se presentan diferencias significativas entre algunos grupos taxonómicos de las plantas a que pertenecen. Las diferencias en las dimensiones de estas estructuras no se corresponden con el grado evolutivo de la planta, pero sí con las diferencias del volumen que presenta el núcleo celular; a mayor volumen nuclear mayor volumen nucleolar, aunque las variaciones del tamaño del nucleolo no son tan grandes como entre los volúmenes de los núcleos.

Existen diferencias significativas entre los granos pericromatinianos de las plantas estudiadas. Las diferencias en las dimensiones de estas estructuras no se corresponden con el grado evolutivo de la planta, pero sí con las diferencias del volumen que presenta el núcleo celular. Al igual que en el caso del nucleolo, los nucleos con mayor volumen poseen granos pericromatinianos más grandes.

Los núcleos interfásicos de las especies vegetales poseen características particulares en lo que

se refiere a las dimensiones y morfología de las estructuras que lo integran, lo que permite diferenciarlos según el grupo taxonómico a que pertenecen, pero en lo general presentan un patrón ultraestructural común que consiste en una envoltura nuclear de doble membrana con complejo de poro, matriz nuclear, cromatina compacta generalmente reticulada, nucleolo relativamente pequeño, granos pericromatinianos, granos intercromatinianos dispersos y fibras peri e intercromatinianos.

El patrón ultraestructural de los núcleos de las células vegetales difiere de los patrones ultraestructura de los núcleos de la mayoría de los protozoarios pero es muy semejante al patrón ultraestructural de los núcleos de las células animales. Estas características sugieren la posibilidad que los organismos del reino vegetal y animal tengan un origen común entre los protozoarios semejantes a los de las órdenes de Cryptomonadida y Kinetoplastida ya que éstos también tienen un patrón ultraestructural semejante a los animales y vegetales.

VII. PERSPECTIVAS

Este estudio del núcleo interfásico en células vegetales con un enfoque evolutivo da una visión muy general de las características propias del núcleo de las células vegetales y sus diferencias con los núcleos de protozoarios y células animales. Este estudio deja claro que existe una diversidad morfológica de los núcleos vegetales dentro de la unidad que estos presentan como organismos de un mismo reino. Hasta donde este trabajo ha llegado, no se tiene una explicación de las causas que determinan las diferencias cuantitativas y probablemente cualitativas de las estructuras que constituyen al núcleo vegetal.

Para profundizar sobre lo que aquí se ha tratado y precisar sobre aspectos que permanecen indefinidos podrían realizarse las siguientes investigaciones.

Estudiar núcleos vegetales de diferentes tejidos de la misma planta para encontrar posibles patrones estructurales derivados de la función que la célula.

Estudiar la ultraestructura del núcleo de plantas de la misma especie para ver si existen patrones ultraestructurales característicos de géneros de plantas o grupos muy relacionados.

Estudiar la ultraestructura de núcleos vegetales de algas que han sido relacionadas con los ancestros de las plantas terrestres a fin, de ver cuales presentan una estructura más semejante con estas plantas.

Un estudio que contemple un mayor número de especies dentro de cada nivel evolutivo, daría un mayor apoyo a las conclusiones aquí presentadas. La visión más completa sobre este tema se obtendrá cuando se efectúe en hongos un estudio con enfoque evolutivo, como el realizado en protozoarios, animales y plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C.C. y Workman J.L., 1993. Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72, 3055-308.
- Aguilera, J.A., 1993. Luces y Sombras Sobre el Origen de la Vida. *Mundo Científico* 13, 508-519.
- Akey, C.W. y Radermacher, M., 1993. Architecture of the Xenopus nuclear pore complex revealed by three-Dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 122, 1-19.
- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D., 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York & London.
- Anderson, J.M., 1981. Consequences of spatial separation of photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett.* 124, 1-10.
- Angelier, N., Hemon, D. y Bouteille, M., 1979. Mecanismos of transcription in nucleoli of amphibian oocytes as visualized by High-Resolution Autoradiography. *J. Cell Biol* 80, 277-290.
- Archie, J.W., 1989. Phylogenies of Plant Families a Demonstration of Phylogenetic Randomness in DNA Sequence Data Derived From Proteins. *Evolution* 43, 176-1800.
- Aso, T., Serizawa, H., Conaway, R.C. y Conaway J.W., 1994. A TATA sequence-dependent transcriptional repressor activity associated with mammalian transcription factor IIA. *EMBO J.* 13, 435-445.
- Avers, C.J. 1991. Biología Celular. Grupo Editorial Iberoamérica. México.
- Ayala, F.J. 1978. Mecanismos de la evolución. *Investigación y ciencia* 26, 18-33.
- Bachelier, J.P., Puvion, E. y Zalta., 1975. Ultrastructural organization and biochem isolated from mammalian cell nuclei. *Eur.J. Biochem* 58, 327-337.
- Banks, H.P., 1970. Evolution and Plants of Past. Wadsowarth Publishing Com. EUA.
- Barinaga, M., 1994. Archae and Eukaryotes Grow Closer. *Science* 264, 1251.

- Barlow, P.W., 1977. Determinants of nuclear chromatin structure in angiosperms. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 12 Ser. 18, 193-206
- Barrack, E.R. y Coffey D.S., 1982. Biological properties of the nuclear: steroid hormone binding. *Recent Progress in Hormone Research* 38, 133-195.
- Begun, D.J. y Aquado Ch.F., 1992. Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature* 356, 519-520.
- Bell, S.P., Pikard, C.S., Reeder, R. H. y Mc Stay B., 1993. Efficient expression of a protein coding gene under the control of an RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Research* 21, 3451-3453.
- Benhamou, N., Noel, S., Grenier J. y Asselin A., 1991. Microwave energy fixation of plant tissue: an alternative approach that provides excellent preservation of ultrastructure and antigenicity. *J. Electron Microsc. Technique* 17, 81-94.
- Bernhard, W., 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 250-265.
- Berezney, R. y Coffey D.S., 1977. Nuclear matrix, isolation an characterization of framework from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73, 616-637.
- Bhattacharya, D.; 1992. Algae Containing Chlorophylls a + c are Paraphyletic: Molecular Evolutionary Analysis of the Chromophyta. *Evolution* 46, 1801-1817.
- Blobel, G., 1985. Gene gating: a hipótesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 8527-8529.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. y Kohwi-Shigematsu, T., 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 255, 195-197.
- Bogorad, L., 1975. Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* 188, 891-898.
- Bohinski, R.C., 1978. *Bioquímica*. 2da. ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.
- Bold, H.C., Alexopoulos, C.J. y Delevoryas T., 1989. *Morfología de las plantas y hongos*. Edición Omega S.A. Barcelona Esp.
- Bousquet, J., Strauss, S.H., Doeksen A.H. y Price R.A., 1992. Extensive variation in evolutionary rate of rbcL gene sequences among seed plants. *Proc. Natl. Acad.* 89, 7844-7848.

- Bouvier, J.D., Huber, J., Seve, P. y Bouteille, M., 1982. RNA is responsible for the three-dimensional organization of nuclei matrix protein in Hella cell. *Biol. Cell* 43, 143-146.
- Bozzola, J.J. y Russell, L., 1991. Electron Microscopy. Jones and Bartlett Publishers. Boston EUA.
- Branton, D., Cohen, C.M., y Tyler, J. 1981. Interaction of cytoskeleta proteins on the human erythrocytes membranes. *Cell* 24, 24-32
- Brasch, K. y Ochs, R.L., 1992. Nucleolar bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. *Exp. Cell Res.* 202, 211-223.
- Brown, G.L., Locke, M., 1978. Nucleoprotein localization by bismuth staining. *Tissue Cell* 10, 365-388
- Bungert, R., Waldschmidt, R., Kober I. y Serfart, K.H., 1992. Transcription factor IIA is inactivated during terminal differentiation of avian erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11678-11682.
- Byrely, G.R., Lowe, D.R., Walsh, M.M., 1986. Stromatolites from the 3,300-3500-Myr Swaziland Supergroup, Barberton Mountain Land, South Africa. *Nature* 319, 489-491.
- Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J. y Lamond, A.I., 1993. Assembly of snRNP-containing Coiled Bodies Is Regulated in Interphase and Mitosis-Evidence that the Coiled Body is a Kinetic Nuclear Structure. *J. Cell Biol.* 120, 841-852.
- Carnal, O. y Mlynek, 1993. La óptica atómica. *Mundo Científico* 12, 1008-1016.
- Cavalier-Smith, T., 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *BioSystems* 14, 461-481.
- Cavalier-Smith, D., 1975. The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature* 256, 463-468.
- Chang, S.H., Hecker, L.I., Silberklang, M., Raj Bhandary, U.L. y Barnett E.E., 1981. The nucleotide sequence of cytoplasmic phenylalanine transfer RNA. Evidence for possible classification of the euglenophytes among the animal rather than the plant kingdom. *Nucl. Acids Res.* 9, 3199-3204.
- Chaudhary N. y Courvalin J., 1993. Stepwise Reassembly of the Nuclear Envelope at the End of Mitosis *J. Cell Biol.* 122, 295-306.
- Choy, B. y Green, M.R., 1993. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 366, 531- 536.

- Chyba, C. y Sagan, C., 1992. Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origin of life. *Nature* 355, 125-132.
- Cech, T.R., Zaug, A.J. y Grabowski, P.J., 1981. In Vitro Splicing of Ribosomal RNA Precursor of Tetrahymena: Involvement of a Guanosine Nucleotide in the Excision of the Intervening Sequence. *Cell* 27, 487-496.
- Clegg, M.T., 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 363-367.
- Comings, D.E. y Wallack, A.S., 1989. DNA-binding properties of nuclear matrix proteins. *J. Cell Sci.* 34, 233-246.
- Cook, P.R., 1991. The nuclear, Keleton and topology of replication. *Cell* 66, 627-635
- Cordesae, F., Cooke, R., Tremousaygue D., Grellet, F. y Delacny M., 1993. Fine Structure and Evolution of the rDNA Intergenic Spacer in Rice and Other Cereals. *J. Mol. Evol.* 36, 369-379.
- Corliss, J.O., 1984. The kingdom protista and its 45 phyla. *BioSystems* 17, 87-126.
- Coyne, J.A., 1992. Genetic and speciation. *Nature*, 355, 511-515.
- Cox, R.T., 1992. A Comment on Pleistocene Population Bottlenecks in Periodical Cicadas (Homoptera: Cicadidae: Magicicada Spp.). *Evolution* 845-846.
- Crane, P.R., 1993. Time for the angiosperms. *Nature* 366, 631-632.
- Crane, P.R., Donoghue, M.J., Doyle, J.A. y Friis E.M., 1989. Angiosperm origins. *Nature* 342, 131-132.
- Cronquist, A., 1969. Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- Cronquist, A., 1988. The Evolution and classification of flowering plants. (Columbia Univ.Press. Irvington-on-Hudson, N.Y). 2da Ed.
- Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore D., 1990. *Molecular Cell Biology*. (W.H. Freeman and Co., New York). 2da, Ed.
- Daskal, Y., 1981. Perichromatic granules in: The Cell Nucleus, Vol. VIII, H. Busch (ed.) (Academic Press, New York) pp. 117-137.
- De Barbara, M., 1989. Introducción a la Biología. Edit. Omega S.A. Barcelona.

- De Robertis y De Robertis H., 1991. *Biología Celular y Molecular*. El Ateneo, Argentina.
- Devlin, T., 1992. *Textbook of Biochemistry*. 3a ed. Wiley-Liss Ed. E.U.
- Delevoryas, 1974. *Diversificación Vegetal*. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- Dickerson, R.E., 1978. La evolución química y el origen de la vida. *Investigación y Ciencia* No. 29 (Nov), 14-53.
- Dickerson, R. E., 1980. El citocromo c y la evolución del metabolismo energético. *Investigación y Ciencia*. No 44 (mayo), 77-88.
- Dingwall, C. y Laskey R., 1992, The Nuclear Membrane. *Science*, 258, 942-947.
- Dobzhansky, T., Ayala, F.C., Stebbins, G.L. y Valentine, J.W, 1988. *Evolución*. Segunda reimpresión Edit. Omega S.A. Barcelona
- Doelling, J.H., Gaudino, R.J., Pikaard, C.S., 1993. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA gene and spacer promoters in vivo and by transient expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7528-7532.
- Donoghue, M.J., 1989. Phylogenies and the Analysis of Evolutionary Sequences, with Examples from Seed Plants. *Evolution* 43, 1137-1156.
- Doolittle, W.F., 1978. Genes in pieces: were they ever together? *Nature* 272, 581-582.
- Duckett, D. R., Murchie, A.I.H., Bhattacharya, A., Clegg, R.M., Diekmann., Kitzing E.V. y Lilley, D.M.J., 1992. The structure of DNA junction and their interaction with enzymes. *Eur. J. Biochem.* 207, 285-295.
- Dynlacht, B. D., Hoey. T. y Tjian, R., 1991. Isolation of Coactivators Associated with the TATA-Binding Protein That Mediate Transcriptional Activation. *Cell* 66, 563-576.
- Echeverria, O.M., Pagán-Santini, R. y Vázquez-Nin, G.H., 1991. Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol. of the Cell* 72, 223-229.
- Elizundia-Alvarez, J.M., 1985. Ultraestructura del núcleo celular interfásico de algunos taxa del Reino Protista. Aspectos evolutivos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.
- Fakan, S. y Bernhard W., 1973. Nuclear labelling after prolonged 3H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 79, 431-444.

- Falko, S., Lester, G. y Martin, T., 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immuno cytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98, 358-363.
- Falko, S. y Puvion, E., 1980. The ultrastructural localization of nucleolar and axtranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65, 255-299
- Featherstone, C., Darby, M. K., y Gerace, L., 1988. A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA *in vivo*. *J. Cell Biol.* 107, 1289-1297.
- Feldherr, C.M. Kallenbach, E., y Shultz, N., 1984. Movement of a karyophilic taught the nuclear pores of oocytes. *J. Cel Biol.* 99, 2216-2222.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies : an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 763-791.
- Finch, J.T. y Klug, 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73, 1897-1901.
- Foisner, R. y Gerace, L., 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact whit lamins and chomosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267-1279.
- Ford, B.J., 1993. El nacimiento de la microscopia. *Mundo Científico* 13, 126-124.
- Friedman, W.E., 1992. Evidence of a Pre-Angiosperm Origin of Endosperm: Implications for the Evolution of Flowering Plants. *Science* 255, 336-339.
- Friis, E.M., Crane, P.R. y Pedersen, K.R., 1986. Floral evidence for Cretaceous chloranthoid angiosperm. *Nature* 320, 163-164.
- Futuyma, D.J., 1988. Sturm Und Drang and the Evolutionary Synthesis. *Evolution* 42, 217-226.
- Galtier, J. y Rowe, N.P., 1989. A primitive seed-like structure and its implication for early gymnosperm evolution. *Nature* 340, 225-227.
- Gaut, B.S., Muse, A.V., Clark, W.D. y Clegg M.T., 1992. Relative Rates of Nucleotide Substitution at the *rbcL* Locus of Monocotyledonous Plants. *J. Mol. Evol.* 33, 292-301.
- Gerace, L. y Blobel G. 1980. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277-287.

- Gerlach, W.L. y Robaglia, C., 1993. Los ribozimas. *Mundo Científico* 12, 1034-1041.
- Getzenberg, R.H., Pienta, K.J., Ward, W.S. y Coffey D.S., 1991. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J. Cellular Bioch.* 47, 289-299.
- Ghosh, S., 1976. The nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 44, 1-28.
- Gibbs, S.P., 1978. The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green alga. *Can. J. Bot.* 56, 2883-2889.
- Gilbert, W., 1986. The RNA world. *Nature* 319, 618.
- Goessens, G., 1976. The nucleolar fibrillar centers in various cell types "in vitro" and "in vivo". *Cell Tissue Res.* 173, 315-324.
- Goldman, N., 1993. Statistical Tests of Models of DNA Substitution. *J. Mol. Evol.* 36, 182-198.
- Goldstein, D.J., 1992. Resolution in light microscopy studied by computer simulation. *J. Microsc.* 166, 185-197.
- Golenberg, E.M., Giannasi D.E., Clegg M.T., Smiley C.J., Durbin M., Henderson D. y Zurawski., 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344, 656-658.
- Gray, M.W. y Doolittle, W., 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proved? *Microbiol. Rev.* 46, 1-42.
- Greenblatt, J., 1992. Riding high on the TATA box. *Nature* 360, 16-17.
- Grunstein, M., 1992. Histones as Regulators a Genes. *Sci. Am.* (october) pp. 40-47.
- Guthrie, C., 1991. Messenger RNA Splicing in Yeast: Clues to Why the Spliceosome is a Ribonucleoprotein. *Science* 253, 157-163.
- Hallberg, E., Wozniak R.W. y Gunter B., 1993. An Integral Membrane Protein of the Pore Membrane Domain of the Nuclear Envelope Contains a Nucleoporin-like Region. *J. Cell Biol.* 122, 513-521.
- Ham, J., Steger, G. y Yaniv, M., 1994. Cooperativity *in vivo* between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.* 13, 147-157.

- Hartwell, L.H. y Weinert, T.A., 1989. Checkpoint: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hibberd, D.J., 1979. The structure and phylogenetic significance of the flagellar transition region in the chlorophyll c-containing algae. *BioSystems* 11, 243-261.
- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O., y Miligan, R.A., 1992. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69, 1133-1141.
- Hippel, P.H., Yager, T.D., 1992. The Elongation-termination decision in Transcription. *Science* 255, 809-812.
- Hopwood, D., 1972. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochemical J.* 4, 267-303.
- Hopwood, D. y Milne, G., 1992. Fixation. cap. 1 de "Electron Microscopy in biology: a practical approach" Edited by J.R. Harris. OIRL PRESS. EUA.
- Hori, H., Lim B-L. y Osawa S., 1985. Evolution of green plants as deduced from 5 rRNA sequences. *Proc. Natl. Sci.* 82, 820-823.
- Horobin, R.W., Gerrits P.O. y Wright D.J., 1991. Effects of staining-reagent lipophilicity on the staining of glycol-methacrylate-embedded tissues. *J. Microsc.* 166, 199-205.
- Hozák, P., Hassan, A.B., Jacson, D.A. y Cook, P.R., 1993. Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* 73, 361-373.
- Inaga, S., Osatake, H. y Tanaka K., 1991. SEM images of DNA double helix and nucleosomes observed by ultrahigh-resolution Scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 40, 181-186.
- Jansen, R.K., Holsinger K.E., Michahels H.J. y Palmer J.D., 1990. Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Restriction Site Data at Higher Taxonomic Levels: an Example from the Asteraceae. *Evolution* 44, 20089-2105.
- Jimenes-García L.F., Elizundia, J.M., López-Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría O.M. y Vázquez-Nin G.H., 1989. Implications for evolutions of nuclear structures of animals, plants, fungi and potocists. *BioSystems* 22, 103-116.
- Jiménez-García, L.F. y Segura-Valdez, M. de L., 1993. El origen y la evolución del núcleo celular. en *Temas de Biología Evolutiva*. 155-175. Juan Nuñez-Farfán y Carlos Cordero. Ed.

- Jimenez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs R.L., Echeverría O.M., Vázquez-Nin y Busch, H., 1993. Electron Microscopic Localization of Ribosomal DNA in Rat Liver Nucleoli by Nonisotopic *in Situ* Hybridization. *Exp. Cell Res.* 207, 20-225.
- Jimenez-García, L.F., 1983. Evolución nuclear en animales: Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM., México.
- Joachim J. Li y Raymond J. Deshaies. 1993. Exercising Self-Restraint: Discouraging Illicit Acts of S and M in Eukaryotes. *Cell* 74, 223-226.
- Jordan, E. G., 1984. Nucleolar nomenclature. *J. Cell Sci.* 67, 217-220.
- Joyce, G.F., 1992. Directed Molecular Evolution. *Scientific American* (december), 48-55.
- Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F. y Grunstein, M. 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensible for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27-39.
- Karp G. 1987. Biología Celular. Edit. Mc GRAW-HILL. México.
- Kelly T.J., y Col. 1993. The Fission Yeast *cdc18+* Gene Product Couples S Phase to START and Mitosis. *Cell* 74, 371-382.
- Kim, S-Hiy Lin, R. J., 1993. Pre-mRNA splicing within a assembled yeast. Splicesoma requires an RNA-dependent ATPase and ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 888-892.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kishino, H. y Hasegawa, M., 1989. Evaluation of the Maximum Likelihood Estimate of the Evolutionary Tree Topologies from DNA Sequence Data, and the Branching Order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29, 170-179.
- Kivic, P.A. y Walne, P.L., 1983. Alga photosensory apparatus probably represents multiple parallel evolutions. *BioSystems* 16, 31-38.
- Knoll, A.H., 1992. The Early Evolution of Eukaryotes: A Geological Perspective. *Science* 256, 622-627.

- Knox, E.B., Downie, S.R. y Palmer, J.D., 1993. Chloroplast Genome Rearrangements: the Evolution of Giant Lobelia from Herbaceous Ancestors. *Mol. Biol. Evol.* 10, 414-430.
- Kornberg, R.D. y Klug A., 1981. The nucleosome. *Sci. Am.* 244; 52-64.
- Kumazaki, T., Hiroshi, E. y Osawa S., 1983. Phylogeny of Protozoa Deduced from 5S rRNA Sequences. *J. Mol. Evol.* 19, 411-419.
- Lafontaine, J.G. y Luck, B.T., 1980. An ultrastructural study of plant cell (*Allium porrum*) centromeres. *J. Ultrastruct. Res.* 70, 298-307.
- Lafontaine, J.G., Luck, B.T. y Dontigny, D., 1979. A cytochemical and radioautographic study of the ultrastructural organization of puff-like fibrillar structures in plant interphase nuclei (*Allium porum*). *J. Cell Sci.* 39, 13-27.
- Lazcano-Araujo, A., 1989. El origen de la vida: Evolución química y evolución biológica. 3 ed. Mex., Trillas: Anuies (Reimp. 1992).
- Leduc, E.H. y Bernhard, W., 1967. Recent modification of the glycol metacrylate embedding procedure. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 196-199.
- Lee, CH.P., Madal N., Dyson M.R. y Raschacary U.L., 1993. The discriminator base influences tRNA structure at the end of the acceptor stem and possibly its interaction with proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7149-7152.
- Lehninger, A.L., 1991. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da Ed. 15ta Imp. Ediciones Omega S.A.
- Lehmann, H., Kunz, U. y Jacob A., 1991. A simplified preparation procedure of plant material for elemental analysis by ESI and EELS techniques. *J. Microsc.* 162, 77-82.
- Lehmann, W. y Wachtel, A., 1993. Numerical apertures of light microscope objectives. *J. Microsc.* 169, 89-90.
- Lenski, R.E. y Mittler, J.E., 1993. The Directed Mutation Controversy and Neo-Darwinism. *Science* 259, 188-194.
- Les, D.H., Garvin, D.K. y Wimpee, Ch.F., 1991. Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperm. *Proc. Acad. Sci.* 88, 10119-10123.
- Li, Y., Flanagan, P.M., Tschochner, H. y Kornberg, R.D., 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263, 805-807.

- Li, W-H., 1993. Unbiased Estimation of the Rates of Synonymous and Nonsynonymous Substitution. *J. Mol. Evol.* 36, 96-99.
- Li, W-H., Gouy M., Wolfe K.H. y Sharp P. M., 1989. Angiosperm origins. *Nature* 342, 131-132.
- Lidgard, S. y Crane, P.R., 1988. Quantitative analyses of the early angiosperm radiation. *Nature* 331, 344-346.
- Lim, B-L., Kawai, H., Hori, H. y Osawa, S., 1986. Molecular evolution of 5S ribosomal RNA from red and brown algae. *Jpn. J. Genet.* 61, 169-176.
- Luck, B.T. y Lafontaine, J.G., 1980. An ultracytochemical study of nuclear organization in meristematic plant cells (*Allium porum*). *J. Cell Sci.* 43, 37-58.
- Luck, B. T., Lafontaine, J. G., 1983. An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cells (*Cicer arietinum*). *Can. J. Bot.* 60, 611-619.
- Luft, J. H., 1992. Fixation for biological ultrastructure. I. A viscometric analysis of the interaction between glutaraldehyde and bovine serum albumin. *J. Microsc.* 167, 247-258.
- Luft, J. H., 1992. Fixation for biological ultrastructure. II. Cross-linking of bovine serum albumin by nanosecond pulses of ionizing radiation. *J. Microsc.* 167, 259-272.
- Maeda, Y., Hisatake, K., Kondo, T., Hanada K-i., Song, Ch-Z., Nishimura, T. y Muramatsu, M., 1992. Mouse rRNA gene transcription factor mUBF requires both HMG-box 1 and acidic tail for nucleolar accumulation: molecular analysis of the nucleolar targeting mechanism. *EMBO J.* 11, 3695-3704.
- Mah, D.C., Dijkwel, P.A., Todd, A., Klein, V., Price, G. y Zannis-Hadjopoulos, M., 1993. ors12, a mammalian autonomously replicating DNA sequence, associates with the nuclear matrix in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* 105, 807-818.
- Martin, W., Gierl, A. y Saedler, H., 1989. Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origins. *Nature* 339, 46-48.
- Martin, W., Gierl A. y Saedler H., 1989. Angiosperm origins. *Nature* 342, 131-132.
- Margulis, L., 1971. Symbiosis and evolution. *Sci. Am.*, 225, 48-61.
- Margulis, L. y Schwartz, K., 1982. Five Kingdoms: An Illustrated Guide of the Phyla of life in Earth. Freeman and Co., San Francisco.

- Margulis, L., 1993. Symbiosis in Cell Evolution: microbial communities in the Archean and Prokaryotic eons. 2nd ed. W.H. Freeman and Company.**
- Mayr, E., 1978. La evolución. Investigación y Ciencia 26, 7-16.**
- Mc Quade, A. B., 1983. Origins of the nucleate organisms. II. BioSystem, 16, 39-55.**
- Medina, F.J., Risueño, M.C. y Moreno Díaz de la Espina S., 1983. 3-D Reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cell in relation to nucleolar activity. Biol. Cell 48, 31-38.**
- Medina, F.J., Risueño, M.C., Moreno Díaz de la Espina S., 1983. 3-D reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cells in relation to nucleolar activity. Biol. Cell 48:31-38**
- Medina M.A., Moreno Díaz de la Espina S., Martín M. y Fernández-Gómez M.H., 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. Biol. of the Cell 67, 331-339.**
- Mikelsaar, R., 1987. A view of Early Cellular Evolution. J. Mol. Evol. 25, 168-183.**
- Miller, O.L. Jr., 1973 The visualization of genes in action Sci. Amer. 229, 34.**
- Miller, S.L., 1953. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. Science 117, 528-529.**
- Miller, T.E., Huang, Ch., Pogo, O., 1978. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing HnRNA. J. Cell Biol. 76, 695-691.**
- Mirre, C. y Stahl, A., 1981. Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocyte J. Cell Sci. 48, 105-126.**
- Moens, P.B. y Church K., 1977. Centromere sizes position and movements in the interphase nucleus. Chromosoma 61, 41-48.**
- Monneron, A. y Bernhard, W., 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. J. Ultrastruc. Res. 27, 266-288.**
- Moreno Díaz de la Espina S., Sánchez-Piña M.A. y Risueño M.C., 1982. Localization of acid phosphate ions and inorganic cations in plant nuclear coiled bodies. Cell Biol. Int. Rep. 6, 601-607.**
- Moreno Díaz de la Espina S. y Risueño, M.C., 1977. Fibrillar bodies in *Allium cepa* : an ultrastructural and cytochemical study. Biol. Cellulaire 30, 93-102.**

- Moreno Dfáz de la Espina, S., Barthelemy, I. y Cerezuela M.A., 1991. Isolation and ultrastructural characterization of the residual nuclear matrix in plant cell system. *Chromosoma* 100, 110-117.
- Moreno Dfáz de la Espina S, Risueno MC., 1977. Fibrillar bodies in *Allium cepa*: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell* 30, 93-102.
- Moreno Dfáz de la Espina S, Medina FJ, Risueno MC 1980. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vaculation in plant cells. *Eur. J. Cell Biol* 22:724-729
- Morioka, H., Suganuma, A. y Tachibana, M., 1992. Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* as revealed by microwave fixation. *J. Electron Microsc.* 41, 1-6.
- Morre, M.S. y Blobel G., 1992. The two step of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 69, 939-950.
- Morrison, R.T. y Boyd R.N., 1976. *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.
- Murray, A. y Kirschner, M.W., 1991. What Controls the Cell Cycle. *Sci. Am.* (March) pp 56-63.
- Nagl, W., 1982. Nuclear chromatin. En: Boulter D, Parthier B. (eds). *Encyclopedia of plant physiology*. 14b Nucleic acids and proteins in plant physiology. 14b Nucleic acids and proteins in plants II. Springer, Berlin, Heidelberg New York.
- Naito, N., Yamada, N., Kobori, H. y Osumi, M., 1991. Contrast enhancement by ruthenium tetroxide for observation of the ultrastructure of yeast cells. *J. Electron Microsc.* 40, 416-419.
- Niklas K.J., 1985. The Evolution of Tracheid Diameter in Early Vascular Plants and its Implications on the Hydraulic Conductance of the Primary Xylem Strand. *Evolution* 39, 1110-1122.
- Nash, R.E., Puvion y Bernhard W., 1975. Perichromatin fibrils as components of rapid labeled extranucleolar RNA. *J. Ultrastr. Res.* 53, 395-405.
- Nigg, E.A., 1989. The nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 345-440.
- Nigg, W.A. 1992. Assembly-Disassembly to t4 Nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 105-109.

- Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.
- Ossowski, I.V., Hausner, G. y Loewen P.C., 1993. Molecular Evolutionary Analysis Based on the Amino Acid Sequence of Catalase. *J. Mol. Evol.* 37, 71-76.
- Paabo, S., 1993. Ancient DNA. *Sci. Am.* 269, 60-66.
- Paddy, M. R., Belmont, A. S., Saumweber, H., Agard, D. A., y Sedat, J. W. 1990. Interfase nuclear envelope lamins for a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* 62, 89-106
- Palmer, T.D., Miller, A.D., Reeder, R.H. y Mc Stay B., 1993. Efficient expression of a protein coding gene under the control of an RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Research* 21, 3451-3453.
- Panté, N. y Aebi U., 1993. The Nuclear Pore Complex. *J. Cell Biol.* 122, 977-984.
- Perasso, R., Baroin, A., Hu Qo L., Bachellerie, J. P., y Adoutte A. 1989. Origin of the Algae. *Nature* 339, 142-144.
- Pugh, B.F. y Tjian, R., 1992. Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J. Biol. Chem.* 267, 679-682.
- Puracchia, C. y Mittler, B.S., 1972. New glutaraldehyde fixation procedures. *J. Ultr. Res.* 39, 57-64.
- Puvion, E. y Lange, M., 1980. Functional significance of perichromatin granules accumulation induced by cadmium chloride in isolated rat liver cells. *Exptl. Cell. Res.* 128, 47-58.
- Puvion, E. y Moyne, G., 1981. In situ localization of RNA structures. En Bush, H. (Ed), *The cell nucleus*, vol. VIII, chapt 2, pp 86-87. Academic Press, USA.
- Raubeson, L.A. y Jansen R. K., 1992. Chloroplast DNA Evidence on the Ancient Evolutionary Split in Vascular Land Plants. *Science* 225, 1697-1699.
- Rawn, J. D., 1989. *Bioquímica*. Mc. Graw Hill-Interamericana de España Madrid. Primera Edición.
- Remy, W. 1982. Lower Devonian Gametophytes: Telation to the Phylogeny of Land Plants. *Science* 215, 1625-1627.
- Richards, F.M. y Knowles, J.R., 1968. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *J. Mol. Biol.* 37, 231-233.

- Rigby, P.W.J., 1993. Three in one and one in three: it all depends on TBP Cell 72, 7-10
- Risueño, M. C., Moreno Fíaz de la Espina, S., 1979. Ultrastructural and cytochemical study of the quiescent root meristematic cell nucleus. J Submicrosc Cytol 11:85-98
- Risueño, M.C., Medina, FJ, Moreno Díaz de la Espina, S., 1979. Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. J. Cell Sci. 58, 313-329
- Risueño, M.C., Moreno Díaz de la Espina, S., Fernández-Gómez M.H. y Giménez-Martín G., 1978. Nuclear micropuffs in *Allium cepa* cells. I. Quantitative, cytochemische and elektronen mikroskopische ntersuchunger. Eur. J. of Cell Biol. 16, 209-223.
- Risueño, M.C., Medina, F.J. y Moreno Díaz de la Espina, S., 1982. Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: Ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. J. Cell Sci. 58, 313-329.
- Ritossa, M.F. y Sigelman S., 1965. Localization of DNA complementary to rRNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. 53, 737-745.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., y Dinagwall, C., 1991. Two interdependent basic domains in nucleopasmin nuclear targeting sequence: identificarion of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64, 615-623
- Rogers, S.O. Benedich A.J., 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. Plant Mol. Biol. 9, 509-520
- Roland, Foisner y Larry G., 1993. Integral Membrane Proteins of the nuclear Enveope Interact with lamins a chromosomes, and binding is modulated by mitotic Phosphorylation, Cell 73,1267-1279.
- Rowlands, T., Baumann, P. y Jackson, S P., 1994. The TATA-Binding Protein: A General Transcription factor in Eukaryotes and Archaeobacteria. Science 264, 1326-1329.
- Sabatini, D.D., Besch, K. y Barnett, R.J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell Biol. 17, 19-58.
- Scigel, R.F., Bandoni R.J., Maze J.R., Rouse G.E., Schofield W.B., Stein J.R., 1984. Plants: an evolutionary Survely. Ed. Wadsworth Inc.
- Saccone, C., Lanave, C. y Pesole, G., 1993. Time and Biosequences. J. Mol. Evol. 37, 154-159.

- Sharp, P.A., 1992. TATA-Binding protein is a classless factor. *Cell* 68, 819-821.
- Sharpless, K., Biegel, D., Yang, T., y Pachter, J.S., 1993. β -Actin mRNA-binding proteins associated with the cytoskeletal framework. *Eur J. Biochem.* 212, 217-225.
- Schidlowski, M., 1988. A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. *Nature* 333, 113-318.
- Schlesinger, G., y Miller, S., 1983. Trebiotic Synthesis in Atmospheres Containing CH₄, CO, and CO₂. *J. Mol. Evol.* 19, 383-390.
- Schmidt-Zachmann, M.S., Dargemont, C., Kuhn C. y Nigg, E.A., 1993. Nuclear Export of Proteins: The role of Nuclear retention. *Cell* 74, 493-504.
- Schopf, J.W., 1978, La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia.* No 29 (Nov), 59-76.
- Schopf, J.W. y Packer, B. M., 1987. Early Archean (3.3-Billion to 3.5-Billion-Year-Old) Microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70-73.
- Schwemmler, W., 1984. Evolution of Eucytes. en: *Reconstruction of Cell Evolution: a Periodic System.* CRC Press. Inc. EUA.
- Smith, S. y Bobel, G., 1993. The first membrane spanning region of the Lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* 120, 631-637.
- Soullam, B. y Worman H. J., 1993. The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J. Cell Biol.* 120, 1093-1100.
- Stanier, R.Y. y Cohen-Baziere, G., 1977. Phototrophic prokaryotes : the cyanobacteria. *Annual Rev. Microbial* 31, 225-274.
- Stent, G.S., y Calendar R., 1981. *Genética Molecular.* 2da Ed. Ediciones Omega, S.A. España.
- Stewart, K.D. y Mattox K.D., 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls a and b. *The Botanical Review* 11, 104-131.
- Svaren, J. y Chalkley, R., 1990. The structure and assembly of active chromatin. *Trends Genet* 6, 52-56
- Sukegawa, J. y Bobel G., 1993. A nuclear Pore Complex Protein that Contains Zinc Finger Motifs, Binds DNA, and faces the Nucleoplasm. *Cell* 72, 29-38.

- Swift, H., 1963. Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exptl Cell Res. Suppl.* 9, 54-67.
- Tandley, B., 1990. Improved uranyl acetate staining for electron microscopy. *J. Electron Microsc. Technique* 16, 81-81.
- Tanksley, S. y Pichersky E., 1988. **Organization and Evolution of Sequences in the Plant Nuclear Genome. Capítulo 3 de Plant Evolutionary Biology.** Edited by Leslie D. Gofflieb y Subodh K. Jain. Chapman and Hall Ltd. London New York.
- Tajima, F., 1993. Unbiased Estimation of Evolutionary Distance between Nucleotide Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 10, 677-688.
- Tremousaygue, D., Laudic, M., Greket, F. y Delseny M. 1992. *Pant. Mol. Biol.* 18, 1013-1018.
- Troitsky, A.V., Melekhovets Y.F., Rakhimova G.M. y Antonov A.S., 1991. Angiosperm Origin an Early Stages of Seed Pant Evolution Deduced from rRNA Sequence Comparisons. *J. Mol. Evol.* 32, 252-261.
- Tuma, R.S., Stolk J.A. y Roth M.B., 1993 Identification and Characterization of a Sphere Organelle Protein. *J. Cell Biol.* 122, 767-773.
- Valentine, J.W., 1978. La evolución de las plantas y los animales pluricelulares . *Investigación y Ciencia* 26, 77-88.
- Van, V.L.M. y Matorana V.C., 1980, The Archaeobacteria and eukaryotic origins. *Nature* 287, 248-250
- Vázquez-Nin, G.H., Chávez. y Tomás Martín, C. 1973. A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microsc.* 16, 243-246.
- Vázquez-Nin, G.H y Echevarría, O.M., 1984. La microscopia electrónica de especímenes biológicos. *Naturaleza* 2, 83-92.
- Vázquez-Nin, G.H., Ortega-Rangel, J.A., Echevarría, O.M., Parra, M.R. y Jiménez García L.F. 1983. Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *Biol. of the Cell* 48, 17-24.
- Verheijen, R., van Venrooij W. y Remaekers F., 1988. The nuclear matrix: Structure and composition. *J. Cell Sci.* 90, 11-36
- von Kries J. P. Bubrmester. H y Straling W. H., 1991. A matrix Iscafold attachment. region binding protein: identification Purification and mode of binding. *Cell* 64, 123-135.

- Wachtershauser G., 1988. Before Enzymes and Templates: Theory of Surface Metabolism. *Microbiol. Rev.* 52, 452-484.
- Wassarman, D.A. y Steitz, J.A., 1991. Alive with DEAD protein. *Nature* 349, 463-464.
- Wasserman S.A., White J.H. y Cozzarelli N R., 1988, The helical repeat of double-stranded DNA varies as a function of catenation and supercoiling. *Nature* 334, 448-453.
- Watson, J.D. y Crick H.C., 1953. A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 737.
- Wayne, M. Beker y Deamer D. W., 1991. The World of the Cell. Benjamin/Cummings Publishin Company Inc. EUA. p. 389-393. Barcelona Esp.
- Willis, I.W., 1993. RNA polymerase III: Genes, Factors and Transcriptional Apecificity. *Eur. J. Biochem.* 212, 1-11.
- Woese C.R., 1981 Archaeobacteria. *Sci. Am.* 244, 94-106.
- Wolfe, K.H., Gouy M., Yang Y-W., Sharp P.M y Li W-H., 1989. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6201-6205.
- Wolfe, K.H., Li W-H. y Sharp P.M., 1987. Rates of nucetotide substitution vary of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, Chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 9054.
- Wood, S.H. y Colins J. M., 1986. Prefeential binding al DNA Primase to the nuclear matrix in Hela Cell. *J. Biol. Chem.* 261, 7119-7122.
- Zaug, A.J., Been M.D. y Cech T.R., 1986. The *Tetrahymena* ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease. *Nature* 324, 429-433.
- Zimerman W. 1976. Evolucion Vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona Esp.