



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL Y ASPECTOS DE LA BIOGÉNESIS DE LOS
GRÁNULOS DE LACANDONIA EN TRES ESPECIES DE LA DIVISIÓN BRIOFITA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. CÉSAR DAMIÁN ALONSO MURILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM.
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL Y ASPECTOS DE LA BIOGÉNESIS DE LOS
GRÁNULOS DE LACANDONIA EN TRES ESPECIES DE LA DIVISIÓN BRIOFITA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. CÉSAR DAMIÁN ALONSO MURILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM.
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016.



OFICIO FCIE/DEP/056/16

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de enero de 2016**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **ALONSO MURILLO CÉSAR DAMIÁN** con número de cuenta **95030337** con la tesis titulada: "Análisis ultraestructural y aspectos de la biogénesis de los gránulos de Lacandonia en tres especies de la división Briofita", realizada bajo la dirección del (la) : **DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

Presidente:	DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Vocal:	DRA. GUADALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA
Secretario:	DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Suplente:	DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Suplente	DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 2 de febrero de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme otorgado la oportunidad de ingresar y finalizar el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 367909, por el significativo apoyo económico recibido ininterrumpidamente durante los diez semestres del doctorado.

A mi director de tesis, el Dr. Luis Felipe Jiménez García, por su gran apoyo y enseñanza.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por haberme orientado a lo largo del proyecto y ser una magnífica persona.

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán de la Facultad de Ciencias de la UNAM por sus acertadas sugerencias para la culminación de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Alfonso Cárabez Trejo por su invaluable enseñanza en el campo de la microscopía electrónica.

A la Dra. María Teresa de Lourdes Agredano Moreno por sus atinados comentarios y sugerencias para la culminación de este trabajo.

A la Mtra. Reyna Lara Martínez por sus enseñanzas de microscopía electrónica; así como su paciencia, apoyo incondicional y amistad.

Al Dr. S. R. Gradstein por su valiosa ayuda en la identificación del material biológico.

A la Mtra. Ernestina Ubaldo por compartir su conocimiento de técnicas de microscopía electrónica.

Al Dr. Tomás Nepomuceno por su estímulo y participación en este proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres:

Juan y María Concepción por su amor, apoyo incondicional y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hermana:

Ana Lilia por estar a mi lado en el momento preciso.

A mi compañera:

Ileri Yunuen por darle sentido a mi vida.

ÍNDICE	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Material Genético	3
1.2 Cromatina	6
1.3 Fibras pericromatinianas	10
1.4 Gránulos pericromatinianos	16
1.5 Gránulosintercromatinianos	17
1.6 Gránulos de Lacandonia	18
2. BRIOFITAS	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES	36
10. PERSPECTIVAS	36
11. REFERENCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Dominios nucleares.

Fig. 2. Distribución de la cromatina.

Fig. 3. Esquema de un núcleo en interfase.

Fig. 4. Desplazamiento de las FPC dentro del nucleoplasma.

Fig. 5. Esquema que muestra los procesos para la maduración de ARNm.

Fig. 6. *Splicing* constitutivo y *splicing* alternativo.

Fig. 7. Formación del espliceosoma.

Fig. 8. Corte transversal de *M. polymorpha*.

Fig. 9. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *M. polymorpha*.

Fig. 10. Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *M. polymorpha*.

Fig. 11. Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *M. polymorpha*.

Fig. 12. Corte transversal de esporofito de *P. juniperinum*.

Fig. 13. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *P. juniperinum*.

Fig. 14. Micrografías electrónica de transmisión de dos núcleos de *P. juniperinum*.

Fig. 15. Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *P. juniperinum*.

Fig. 16. Sección transversal de esporofito de *A. punctatus*.

Fig. 17. Micrografía electrónica de transmisión de *A. punctatus*.

Fig. 18. Micrografía del núcleo de una célula de *A. punctatus*.

Fig. 19. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *A. punctatus*.

RESUMEN

La evolución del reino vegetal es controversial y las briofitas han sido propuestas como uno de los grupos que divergió tempranamente dentro del proceso evolutivo. El origen y diversificación de las plantas terrestres marca un intervalo de innovación sin precedentes, un ejemplo es el descubrimiento *Lacandonia schismatica* por Martínez y Ramos, cuya característica principal es la inversión de sus órganos sexuales, la cual ha sido relacionada con eventos evolutivos. Estudios ultraestructurales de los núcleos de *Lacandonia schismatica* revelaron la presencia de una novedosa partícula llamada gránulo de Lacandonia. Análisis citoquímicos, inmunocitoquímicos e hibridación *in situ* sugirieron que los gránulos de Lacandonia están involucrados con el almacén y procesamiento del ARN mensajero. Los gránulos de Lacandonia se han localizado en otras angiospermas del orden triuridales y también dentro del grupo de las gimnospermas. Con el fin de comprender la evolución del procesamiento del ARN mensajero, hemos demostrado la presencia de los gránulos de Lacandonia en las plantas no vasculares (Briofitas). Se analizaron tres especies de Briofitas por microscopía electrónica de transmisión y encontramos gránulos en los núcleos de los esporofitos de todas las especies estudiadas. Se observaron partículas no abundantes de 32 nm de diámetro y fibras pericromatinianas en continuidad con dichos gránulos. Este estudio sugiere que los gránulos de Lacandonia contribuyen a la comprensión de la organización espacio-temporal de algunos factores que intervienen en el procesamiento del ARN mensajero y evidencia la conservación del evento a lo largo del proceso evolutivo en el reino vegetal.

ABSTRACT

The early evolution of the plant kingdom is controversial, and bryophytes are argued to be the earliest divergent plants. Indeed, the origin and diversification of land plants marks an interval of unparalleled innovation in the history of plant life. Previous ultrastructural analysis of the nucleus revealed the presence of Lacandonia granules. Cytochemical, immunocytochemical and *in situ* hybridization studies suggested that Lacandonia granules are involved in mRNA storage. In addition, Lacandonia granules have been located in other flowering plants of the order Triuridales (such as *Triuris alata*) and also in non-flowering plants. Therefore, in order to understand the evolution of RNA processing, we demonstrated the presence of Lacandonia granules in three species of non-vascular plants (Bryophytes). In this study, we analyzed three species of Bryophytes using transmission electron microscopy and found granules in sporophyte cell nuclei of all species. Moreover, the presence of few granules in the interchromatin and perichromatin space was a constant feature of all nuclei of Bryophytes. Thus, non-abundant particles of around 32 nm in diameter were observed in the perichromatin and interchromatin space. Perichromatin fibers are usually present in continuity with granules, forming a fibrogranular environment. Finally, we demonstrated that these particles are positive after the EDTA regressive technique preferential for ribonucleoproteins. In summary, this study suggests that Lacandonia granules contribute to the understanding of the spatiotemporal organization of several mRNA processing factors in the nuclear subcompartments and verifies the conservation of the event throughout the evolutionary process in the Plant Kingdom.

INTRODUCCIÓN

Se calcula que la vida vegetal sobre los continentes comenzó hace aproximadamente 425-500 millones de años. En el registro fósil las plantas terrestres aparecen por primera vez hace unos 450 millones de años, en fragmentos que parecen ser de briofitas hepáticas. Las embriofitas son un grupo monofilético formado por descendientes de algas verdes (posiblemente *Coleochaetales* o *Charales*), que se caracterizan por poseer adaptaciones para la vida terrestre. Las embriofitas se clasifican en dos grupos: plantas no vasculares (briofitas) y traqueofitas o “plantas vasculares” (pteridofitas, gimnospermas y angiospermas).

Según Qiu (2006) las briofitas son las primeras plantas que divergieron dentro del proceso evolutivo. Estas plantas pertenecen al subreino Embriophyta porque forman un embrión que se desarrolla a partir del cigoto; son similares a las plantas vasculares porque contienen clorofila, carotenos, xantófilas, almidón verdadero, lípidos, celulosa y hemicelulosa (Delgadillo y Cárdenas, 1990).

El origen y la diversificación temprana de las plantas terrestres marca un intervalo de innovación sin precedentes en la historia de vida de las plantas. A partir de un pequeño grupo de células, las plantas terrestres desarrollaron un elaborado ciclo de vida y una extraordinaria variedad de órganos complejos y sistemas de tejidos. El desarrollo evolutivo de las plantas puede ser estudiado de diferentes modos, cada uno de los cuales proporciona nuevos conocimientos sobre cómo las plantas se han modificado a lo largo del curso evolutivo. Un ejemplo de ello es el descubrimiento de *Lacandonia schismatica* en la Selva Lacandona, Chiapas, México, cuya característica más destacada es la inversión espacial de sus órganos sexuales, lo que puede estar relacionado con cambios evolutivos (Martínez y Ramos, 1989). Jiménez-García y col. (1992) observaron que la distribución de la cromatina

en el núcleo de *L. schismatica* es de tipo reticulado y que se asocia con la presencia de una partícula ribonucleoproteica (RNP), a la que llamaron “gránulo de Lacandonia”. Estas mismas partículas se encontraron en otra planta perteneciente al mismo orden (Triuridales), *Triuris brevistylis*. Por análisis citoquímicos y de hibridación *in situ* se mostró la presencia de ARN en dichas partículas. Agredano-Moreno (1994) mostró que los gránulos de Lacandonia tienen relación con otras partículas ribonucleoproteicas antes descritas, como son los gránulos de los anillos de Balbiani que contienen proteínas SR; Alzhanova-Ericsson y col. (1996) han propuesto que las proteínas SR participan en los procesos de *post-splicing*, como el transporte intranuclear y la translocación del ARNm a través del complejo del poro. Los gránulos intercromatinianos (GIC) también contienen proteínas SR pero se ha descartado su relación con los gránulos de Lacandonia ya que estos últimos no poseen ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP).

Estudios de hibridación *in situ*, Agredano-Moreno y Jiménez-García (2000) mostraron la presencia de ARNm maduro en los gránulos de Lacandonia. El ARNm maduro se caracteriza por la presencia de colas de poly (A), las que participan en el control del recambio y la translocación del ARNm del núcleo al citoplasma. Según Vázquez-Nin y col. (1999) los GPC también contienen Poly (A) lo que permite relacionar a los gránulos de Lacandonia con los GPC y nos sugiere que los gránulos de Lacandonia participan en el almacenaje y transporte de ARNm.

La presencia de gránulos de Lacandonia se ha descrito en *Ginkgo biloba*, (Jiménez-Ramírez, 2002), una gimnosperma; recientemente, Romero-Martínez (2010) reportó la presencia de los gránulos de Lacandonia en dos pteridofitas *Adiantum-capillus-veneris* y *Equisetum hyemale* L.

Material genético

La vida depende de la capacidad de las células de almacenar, reparar y traducir las instrucciones genéticas requeridas en la formación y el mantenimiento de un organismo vivo. Esta información hereditaria depende de la duplicación del material genético, su posterior transferencia a una célula hija en el proceso de división celular y de una generación de organismos a la siguiente por medio de células reproductoras. Estas instrucciones se almacenan en los genes dentro de cada una de las células vivas. Los genes son los elementos que contienen información que determinan las características de una especie en conjunto y de los individuos dentro de ésta (Alberts y cols. 2008).

Según Jiménez-García y Merchant-Larios (2003) un gen es una unidad de información genética y contiene la información para la síntesis de una molécula de ARN que es complementaria a una de las dos hebras del ADN. Los ARN celulares más abundantes (95% del ARN total) son el ARN ribosomal (ARNr), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN mensajero (ARNm). Cada molécula de ARNm contiene la información para la secuencia de aminoácidos de una proteína, mientras que las moléculas de ARNt y ARNr forman parte de la maquinaria celular que traduce la información de los ARNm a proteína.

El nucleóide y la cromatina contienen el genoma del organismo; es decir, poseen la información genética que lo define. El término cromosoma generalmente se refiere a una molécula de ADN del genoma. Las bacterias tienen su genoma en una sola molécula o cromosoma; en los eucariontes el genoma se encuentra distribuido en varias moléculas de ADN o cromosomas.

Se define al genoma como la totalidad de la información guardada en el ADN de un organismo (Alberts y cols. 2008). El genoma puede presentarse en forma difusa dentro del protoplasma o condensada limitada por membrana que recibe el nombre de núcleo. El

compartimento nuclear no existe en todas las células y la ausencia o presencia del núcleo –entendido como compartimento- es la característica principal que se toma en cuenta para definir grandes grupos de seres vivos, los procariontes y eucariontes, respectivamente (Jiménez-García y Merchant-Larios, 2003).

En bacterias el genoma frecuentemente está formado por una molécula circular de ADN; sin embargo, hay bacterias con dos moléculas circulares o con una o más moléculas lineales. Cada molécula contiene una región a partir de la cual de inicia su replicación. Este ADN, tiene un tamaño (número de pares de bases) grande en relación con el volumen que ocupa en la célula; esto hace que el ADN bacteriano se encuentre en las células en una estructura muy compacta denominada nucleoide. Además de una molécula de ADN condensada aproximadamente 1,000 veces, el nucleoide contiene moléculas de ARN, enzimas como la ARN polimerasa y las topoisomerasas y proteínas básicas (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995).

El nucleoide es el equivalente de la cromatina de las células eucariotas. Esta estructura difiere de la cromatina en: 1) las proteínas básicas (tipo histona) presentes en el nucleoide no forman estructuras regulares y compactas como las histonas en los nucleosomas de la cromatina, presentan una organización menos compleja y se disocian más fácilmente del ADN y 2) la tensión helicoidal que compacta al ADN del nucleoide puede ser de tipo plectonómico y toroidal; en la cromatina la tensión se produce principalmente por la interacción ADN-Histonas (superenrollamiento toroidal) (Alberts y cols. 2008).

El genoma de los eucariontes se localiza en un complejo molecular de ADN, ARN y proteínas, conocido como cromatina; hay moléculas adicionales de ADN en organelos como las mitocondrias y los cloroplastos.

En el núcleo se localizan los componentes necesarios para la transcripción de la información genética en ARN, los elementos para el procesamiento del ARN y transporte de éste al citoplasma (Spector, 1993; Misteli, 2001; Alberts y cols. 2008).

El núcleo está limitado por una cisterna similar a las del retículo endoplásmico, denominada envoltura nuclear. Está formada por dos membranas, una externa y otra interna, constituidas como todas las membranas biológicas por dobles capas de fosfolípidos y proteínas. La membrana interna tiene algunas proteínas que no existen en otras membranas. La envoltura nuclear ha sido llamada cisterna perinuclear y es a menudo continua con cisternas del retículo endoplasmático rugoso, como se puede observar en células animales y vegetales; estas continuidades se realizan a través de la membrana externa, ya que la interna nunca participa en ellas. La cisterna perinuclear está interrumpida por poros que permiten el flujo de moléculas entre el citosol y el nucleoplasma (Jiménez-García y Merchant-Larios, 2003).

El interior del núcleo no es una mezcla al azar de componentes de ADN, ARN y proteínas, ya que cada cromosoma en interfase ocupa una región particular del núcleo (Fig. 1). Según Spector (2001) esta organización se alcanza, al menos en parte, mediante la adherencia de partes de los cromosomas a puntos de la lámina nuclear. El ejemplo más obvio de la organización de los cromosomas en el núcleo en interfase es el nucléolo. Éste es la estructura más destacada del núcleo en interfase cuando se le observa al microscopio óptico. El nucléolo es una región donde se agrupan los genes que codifican al ARNr. Aquí se sintetizan los ARNr y se combinan con proteínas lo que da origen a los ribosomas, la maquinaria que participa en la traducción del ARNm y la síntesis de las proteínas.

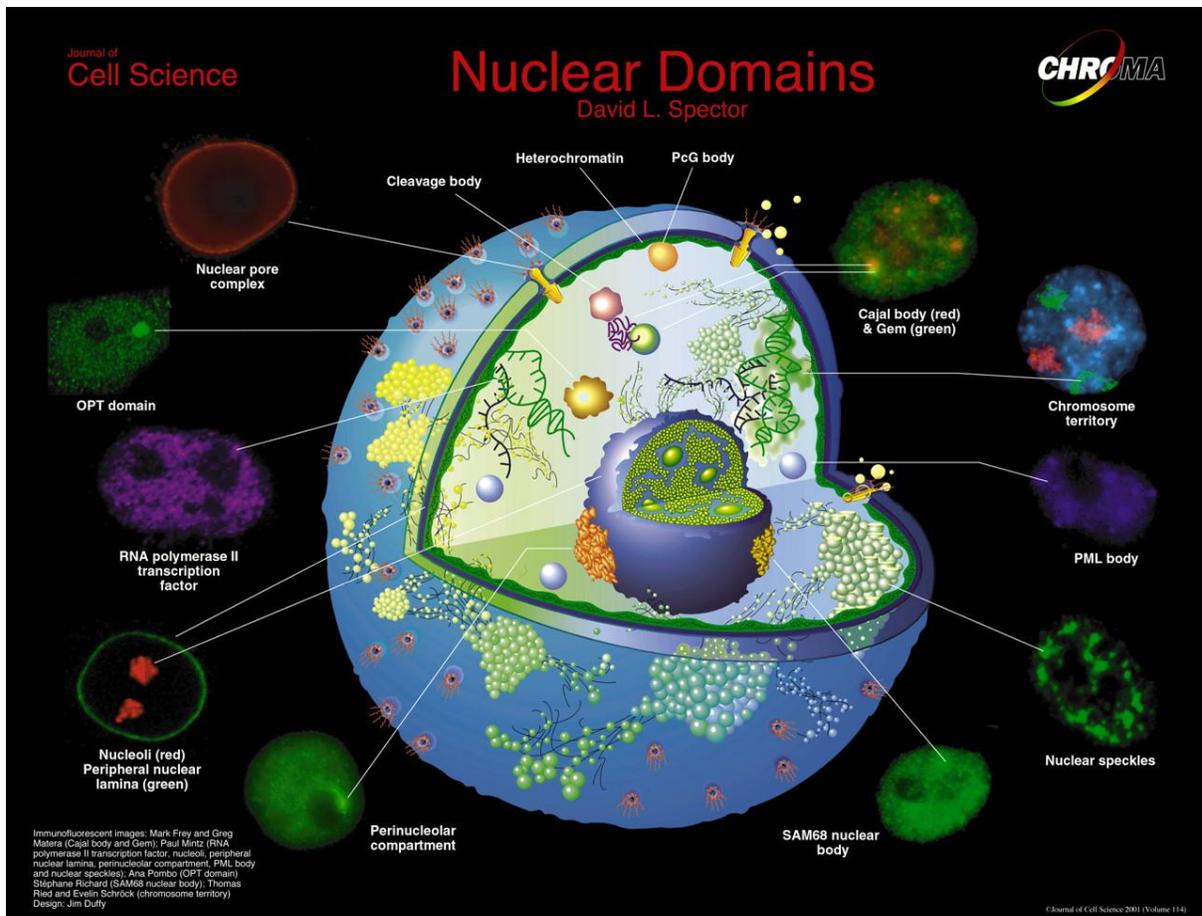


Fig. 1. Dominios nucleares, se observa la organización intranuclear de compartimentos no membranosos (Tomado de Spector, 2001).

Cromatina

Por su gran concentración espacial la cromatina es un dominio nuclear fácilmente observable mediante microscopía óptica o electrónica. En el periodo de interfase la transcripción del ADN es muy activa, por lo cual no se identifican los cromosomas. En esta etapa se pueden visualizar cúmulos de cromatina de diferente tamaño y disposición. Esto depende del estado de compactación del material cromosómico dentro del núcleo, del tipo celular y de su estado fisiológico. De ello se deduce que no toda la cromatina de cada núcleo está en el mismo estado de compactación. La cromatina que se ve con facilidad en forma de grumos o de cúmulos recibe el nombre de cromatina compacta o heterocromatina,

mientras que el resto del material cromosómico está en forma extendida y se le denomina eucromatina. La eucromatina no se observa al microscopio óptico, pues los delgados filamentos que la forman están por debajo de la resolución de éste. Con el microscopio electrónico pueden ponerse de manifiesto los filamentos de cromatina laxa o extendida mediante técnicas de contraste especiales que se unen únicamente a los componentes de la cromatina (Coglia y Gautier, 1973; Vázquez-Nin y cols. 1996).

Desde hace varias décadas se estudia la eucromatina en núcleos en interfase lo que llevó a la idea de la organización de estos componentes es estática (Bernhard, 1969). Estudios recientes muestran que la eucromatina está muy organizada, que contiene regiones bien definidas donde se localiza la infraestructura necesaria para la replicación del ADN, el procesamiento, empaquetado y traslado de los ácidos nucleicos del núcleo al citoplasma (Zimber y cols. 2004).

Estudios en células vivas demuestran que el núcleo interfásico está altamente organizado en regiones subnucleares no membranosas que se denominan dominios nucleares o sencillamente “dominios” (Zaidi y cols. 2005).

La caracterización enzimática de estos dominios permite conocer cuál es el rol que tienen en la actividad nuclear, en la regulación del metabolismo del ARN, el silenciamiento de la cromatina y la expresión de los genes (Verschure, 2004).

La mayoría de los estudios sobre la caracterización de dichos dominios han sido realizados en células de mamífero, por lo que la información de la morfología y dinámica vegetal es escasa (Lokovic y Barta, 2004). En vegetales se observa la presencia de dominios nucleares, *speckles* y cuerpos de cajal, sin embargo aún no es claro el grado de conservación estructural y filogenética entre los diversos grupos de plantas. Por lo cual, el conocimiento de la compleja compartimentalización de la maquinaria del procesamiento

del ARN en vegetales está en sus inicios (Jiménez-García, 1992; Beven y cols. 1995; Majewska y Rodríguez-García, 1996; Lorkovic y Barta, 2004).

En gran parte de los de núcleos interfásicos de hongos y animales, la cromatina compacta se distribuye en grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucléolo y distribuidos en el nucleoplasma. La eucromatina forma asas en la periferia de los cúmulos las que se extienden en el nucleoplasma en longitudes variables. Esta disposición indica que la región que rodea a los grumos heterocromáticos es donde la transcripción es más activa, lo que se muestra por la rápida incorporación de uridina tritiada a dicha zona (Fakan y Bernhard, 1971).

En las plantas la cromatina compacta se distribuye en dos formas: cromocéntrica y reticulada. En la primera, se le observa como grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucléolo y distribuidos en el nucleoplasma (Fig. 2a); en la segunda, los grumos de cromatina se distribuyen por el nucleoplasma formando una red (Fig. 2b) (Jiménez-García y Merchant-Larios, 2003). Jiménez-García y cols. (1992) describieron en los núcleos de *Lacandonia schismatica* estructuras en forma de anillo, elementos estructurales en el nucléolo (centros fibrilares heterogéneos) y los gránulos de Lacandonia.

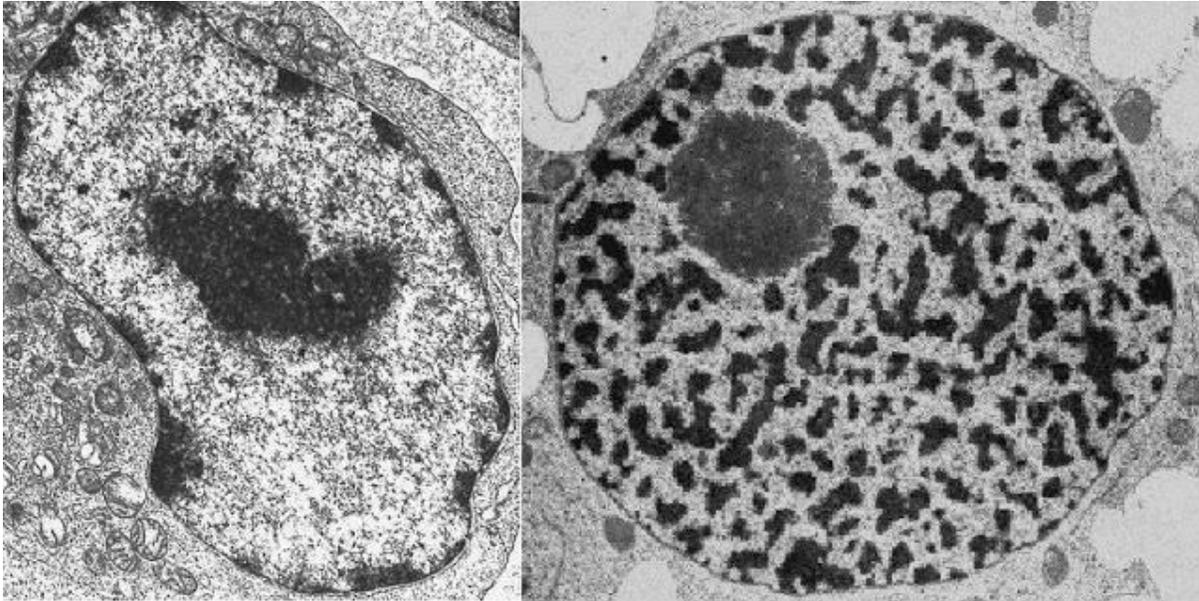


Fig. 2. A) Distribución de la cromatina tipo cromocéntrico con los grumos de cromatina adosados a la envoltura nuclear y B) reticulada con los grumos de cromatina distribuidos en el nucleoplasma y formando una red.

En células vegetales y animales en la región intercromatiniana (espacio no ocupado por el nucléolo ni grumos de cromatina) o pericromatiniana (zona que bordea a los grumos de cromatina) se observan fibras pericromatinianas (FPC), gránulos intercromatinianos (GIC) y gránulos pericromatinianos (GPC) (Fig. 3).



Fig. 3. Esquema de un núcleo en interfase, se muestra la distribución de ribonucleoproteínas: chr (cromatina), pg (gránulos pericromatinianos), flechas (fibras pericromatinianas, ig (gránulos intercromatinianos), un (nucléolo) y cb (cuerpos de Cajal). Tomado de Bernhard, 1969.

Fibras pericromatinianas

Las FPC descritas por Monneron y Bernhard (1969) están formadas por ribonucleoproteínas; se sitúan en los márgenes de los grupos de cromatina compacta (región pericromatiniana).

Estudios de Fakan y Bernhard (1975) en hepatocitos de rata mostraron que la cantidad de FPC refleja la tasa de síntesis de pre-mARN.

Fakan y cols. (1984) mostraron que las FPC incorporan uridina tritiada y se localizan cerca de la cromatina laxa o transcripcionalmente activa y las relacionaron con transcritos nacientes de hnARN (ARN heterogéneo nuclear). Las FPC se desplazan desde la región pericromatiniana a la intercromatiniana y en este transcurso el ARN sufre un proceso de maduración y es transportado al citoplasma (Fig. 4) (Vázquez-Nin y cols. 1978). Las FPC

se encuentran asociadas con los gránulos pericromatinianos e intercromatinianos formados por ARN y proteínas (Puvion y Moyne, 1981).

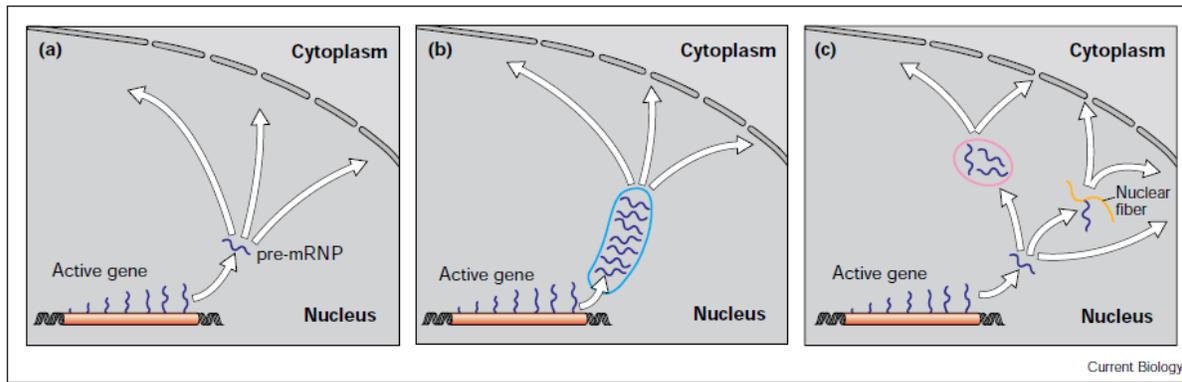


Fig. 4. Desplazamiento de las FPC dentro del nucleoplasma y posterior transporte hacia el citoplasma. (Tomado de Dannebolt, 2000).

Los genes de las células de los eucariontes están segmentados, es decir, la secuencia nucleotídica de los genes contienen segmentos de ADN con información para la síntesis de proteínas (codificantes) alternadas con secuencias que no contienen información para ello (no codificantes), lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gen, llamado ARN pre-mensajero (pre-ARNm) o ARN heterogéneo nuclear (ARNhn) (Fig. 5). Esos transcritos son procesados o madurados en tres reacciones principales: a) La metilación en el extremo 5', que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosina, denominado *cap*, que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción. b) La poliadenilación en el extremo 3', que se refiere a la adición de adeninas en todos los ARNm excepto en los de las histonas, llamada cola de poli A, la cual está formada por una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos lo que evita la degradación del ARN y c) el *splicing*, proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes (intrones) escindiéndolos del pre-ARNm y se unen o empalman las

secuencias codificantes (exones) lo que da origen al ARN mensajero maduro o ARNm (Jiménez-García y Merchant-Larios, 2003). Según Wang y cols. (2012) los intrones no son “ADN basura” como se les ha considerado, ya que tanto exones como intrones pueden regular el proceso de *splicing*, dado que el 90 por ciento de la información para el correcto ensamble de los genes está en los intrones.

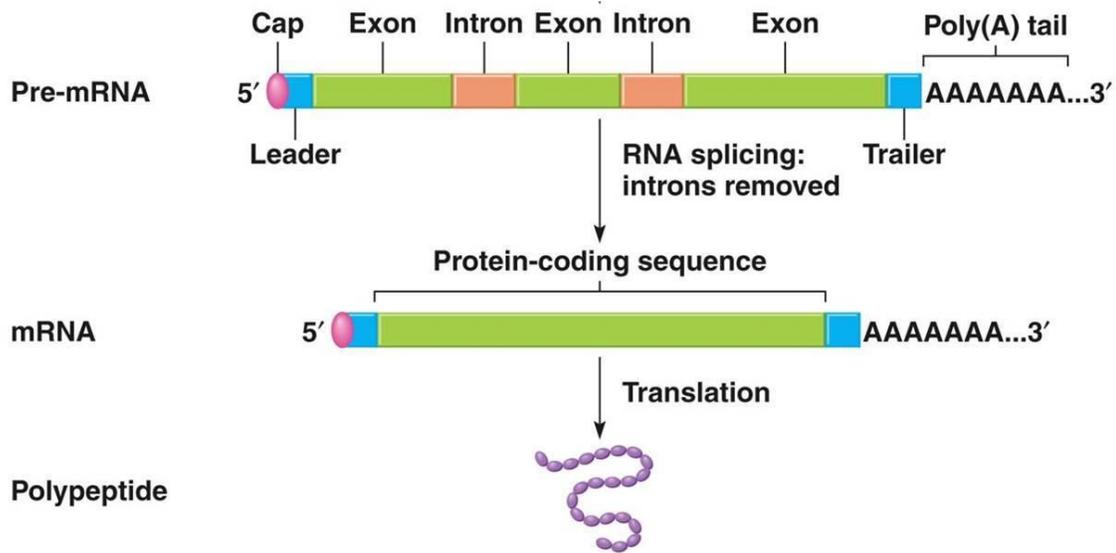


Fig. 5. Esquema que muestra los procesos para la maduración de ARNm: adición de una cap en el extremo 5', corte de intrones y empalme de exones y la adición de una cola de poli A.

Desde el punto de vista químico el *splicing* consiste en dos reacciones sucesivas de transesterificación, lo que requiere un gasto energético que es aportado por la hidrólisis del ATP. El *splicing* es catalizado por un complejo de ribonucleoproteínas llamado “*spliceosoma*”. Este proceso da como resultado la formación del ARNm, que será transportado al citoplasma y en donde será traducido a proteína en el caso de que ocurra *splicing* constitutivo (Fig. 6a) o bien, a diversas proteínas en el caso de que se lleve a cabo *splicing* alternativo (Fig. 6b). Eran y Misteli (2005) sugieren que el *splicing* se lleva a cabo en el núcleo y también puede ser citoplásmico.

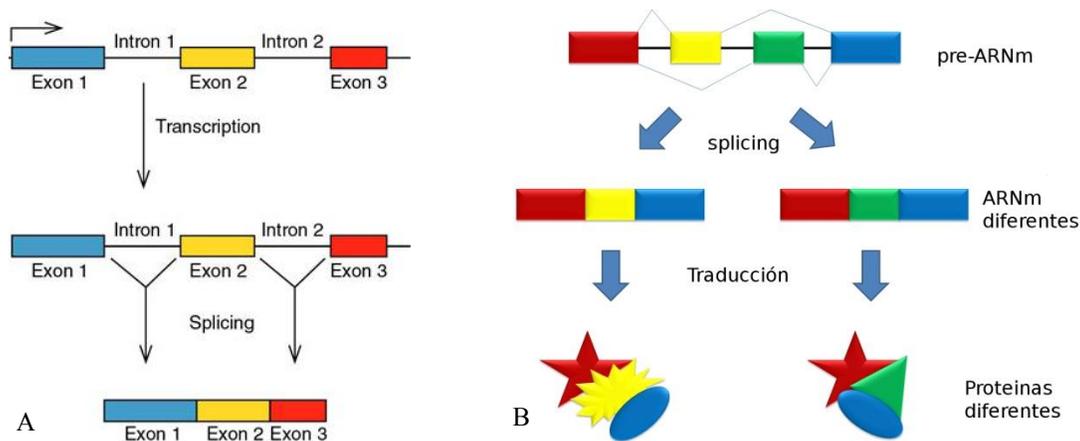


Fig. 6. A) *splicing* constitutivo en donde el transcrito tiene la información para sintetizar una sola proteína y b) *splicing* alternativo, el pre-ARNm es capaz de formar uno o más ARNm maduros y sintetizar una o más proteínas.

Para que se lleve a cabo el *splicing* se requiere de varios factores presentes en el *spliceosoma* los que incluyen diferentes tipos de ARN y proteínas: 1) Los ARN pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnARNs). Existen cinco tipos: U1snARN, U2snARN, U4snARN, U5snARN y U6snARN. El U3snARN participa en eventos de maduración del pre-ARNr (ARN ribosomal inmaduro o precursor). Estos ARNs son transcritos por la ARN polimerasa II, salvo el U6snARN, que lo transcribe la ARN polimerasa III. En el núcleo, los UsnARNs se asocian con proteínas y forman ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs), 2) las partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que contienen ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), son estabilizadoras y se asocian al pre-ARNm lo que impide la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases (Sanford y Caceres, 2004). De esta manera el pre-mARN permanece accesible y puede interactuar con otras moléculas y 3) las proteínas SR, representan una familia de factores de *splicing* descritos en vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando

el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el *splicing* como la definición de los sitios de *splicing* y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Estas proteínas nucleares de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) Tipo I, las cuales presentan un solo motivo de reconocimiento a ARN (RRM) en el extremo amino-terminal y su dominio SR carboxilo terminal y B) Tipo II, las cuales presentan dos motivos de reconocimiento a RNA (RRM) y un dominio carboxilo terminal SR (Ramírez-Núñez, 2007).

En la figura 7 se detallan los cambios que se suceden en el proceso del *splicing*. A partir de un gen segmentado se sintetiza el pre-ARNm el cual tiene varios sitios de acción *cis* o elementos de la misma secuencia. Los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitio de *splicing* 5') e intrón y exón (sitios de *splicing* 3'), respectivamente. El punto de empalme (*branchpoint*) es una secuencia consenso, al menos en levaduras, que es antecedida por adenina. Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos, usualmente) llamada la región Py. En el primer paso se produce la unión del factor U2AF (que tiene el dominio SR) con el sitio Py y de los factores SC35 y SF1. 2) Inmediatamente el U1 se une al sitio de *splicing* 5', que es de reconocimiento y se caracteriza por una secuencia complementaria de U1 con el sitio de unión exón-intrón, lo que resulta en el apareamiento con los primeros seis nucleótidos del intrón, lo que delimita el exón 1. 3) El U2 se acopla al sitio de empalme. 4) El trímero U4/U5/U6snRNP (pre-ensamblado) se adhiere al sitio de empalme donde se unió U2. El U5 se pega al sitio de *splicing* 5' y el U6 se asocia al U2. Este complejo forma un spliceosoma maduro. 5) Se libera el U1, el U5 se desplaza desde el exón hacia el intrón y el U6 se adhiere al sitio de *splicing* 5'. Este paso requiere de la incorporación de aproximadamente 20 bases nitrogenadas entre el U1 y el

U4. Esta incorporación resulta en la activación del spliceosoma lo que da como resultado el desacoplamiento del intrón con el exón (catálisis). La función del U5 es interactuar con secuencias del exón en los sitios de procesamiento 5' y 3'. Se libera el U4. 6) El U5 se une al exón en el sitio de *splicing* 3'. En este punto se cataliza la transesterificación, es decir, se rompe el sitio de *splicing* 5' y se forma el *lariat*. 7) Por último se constituye el complejo que contiene el trímero U2/U5/U6, que permite el rompimiento del sitio de *splicing* 3' y se ligan los exones.

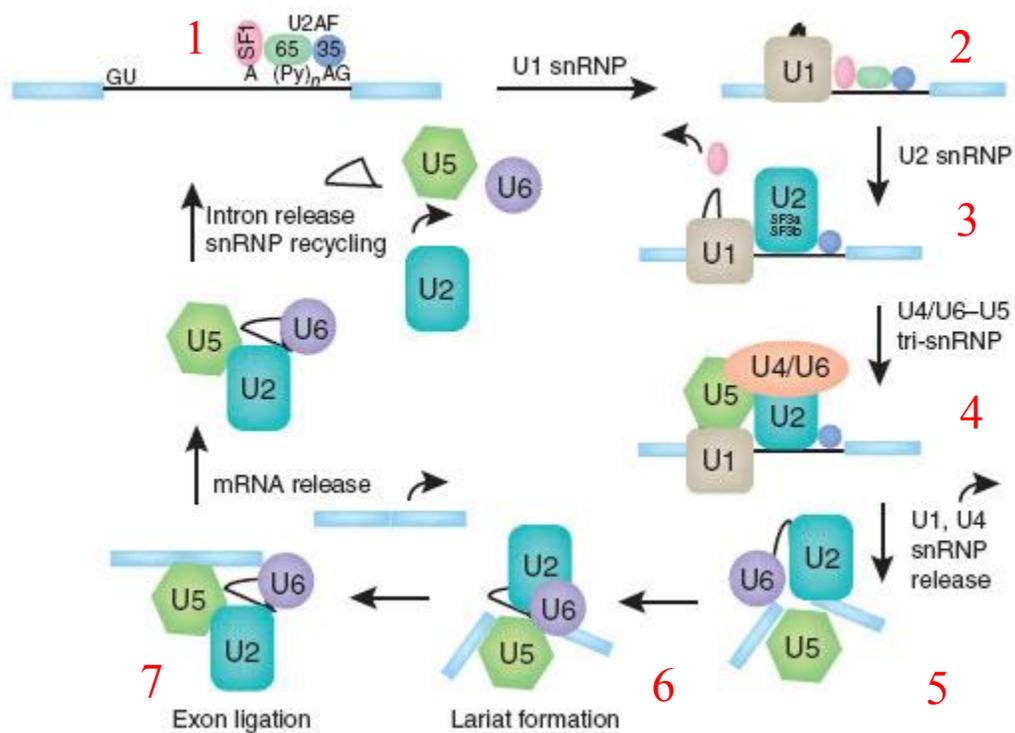


Fig. 7. Formación del spliceosoma: 1) La unión del factor U2AF con el sitio Py; 2) la unión del U1 con el sitio de unión exón-intrón; 3) La unión de U2 al complejo de los factores SC35, SF2/ASF, SF1/BBP. 4) Asociación del trímero U4/U5/U6 (pre-ensamblado) a U2 y formación del spliceosoma maduro. 5) Liberación de U1 y U4 del spliceosoma maduro, desplazamiento de U5 del exón al intrón, unión de U6 al sitio de *splicing* 5'. Este paso se lleva a cabo mediante un apareamiento de aproximadamente 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. 6) Rompimiento del sitio de *splicing* 5' y formación del *lariat*. 7) Formación del complejo U2/U5/U6, rompimiento del sitio de *splicing* 3' y ligadura de los exones.

Las FPC tienen de 3 a 5 nm de longitud, pueden desplazarse hasta el espacio intercromatiniano y suelen estar entremezcladas con los gránulos pericromatinianos (Monneron y Bernhard, 1969; Agredano-Moreno, 2001). En células con gran actividad de expresión génica las FPC se distribuyen homogéneamente en el nucleoplasma ocupando la mayor parte del espacio nuclear exceptuado al nucleólo (Vázquez-Nin y cols. 1999).

Gránulos pericromatinianos

Los GPC son partículas ribonucleoproteicas, EDTA positivas, descritas por Watson en 1962. Son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro, procedentes del enrollamiento de FPC y rodeados por un halo claro de 25 nm (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971), lo cual permite identificarlos mediante microscopía electrónica de transmisión; están ubicados en el borde de los grumos de cromatina compacta, de ahí su nombre, pero también se les puede ver ocasionalmente en la región intercromatiniana.

Vázquez-Nin y cols. (1978) mediante comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas demostraron que los GPC son estructuras idénticas a los gránulos de los anillos de Balbiani y propusieron que ambos gránulos cumplían las mismas funciones.

Por estudios de inmunolocalización ultraestructural *in situ* mostraron que los GPC contienen ARN Poly (A), característica del ARN mensajero maduro (Visa y cols. 1993).

Vázquez-Nin y cols. (1999) sugirieron que los GPC almacenan y transportan ARNm, transcritos de genes muy activos, y que la regulación postranscripcional de la expresión génica está asociada con la velocidad de exportación de los ARNm hacia el citoplasma.

Gránulos intercromatinianos

Los GIC fueron observados por Swift (1959) como cúmulos de gránulos agrupados en la región intercromatiniana. Monneron y Bernhard (1969) los describieron como gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, polimorfos, a veces continuos con fibrillas, compuestos de ARN y proteínas. Dado que los GIC incorporan poca uridina tritiada en tiempos cortos y medios, el ARN de estos gránulos es de vida media larga (Fakan y Bernhard, 1971). Según Fakan y cols. (1984) los ARNs de bajo peso molecular ricos en uridina (ARN_{bpmU}) son los de vida media más larga. Como estos ARNs están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los pre-ARN_m y los GIC no contienen ARN de marcado rápido, ni proteínas que se asocien a los ARN pre-mensajeros, se concluyó que los cúmulos de GIC son almacenes de la maquinaria del *splicing* que carecen del sustrato de dicho proceso, los ARN pre-mensajeros.

Los GIC poseen la mayoría de las proteínas y tipos de ARN que participan en el *splicing*. Entre ellos están cinco partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNP) (U1, U2, U4, U5 y U6). Las snRNP son complejos nucleoplásmicos de ARN y proteínas que funcionan como unidades del *spliceosoma*. Las proteínas de la familia SR, con regiones ricas en Serina y Arginina, que tienen unidos segmentos de ARN, también participan en el *splicing* y el *splicing* alternativo. Los cúmulos de GIC (“*speckles*”) se dispersan cuando la célula entra en mitosis, pero durante la telofase las snRNPs y los factores proteicos del *splicing* se reagrupan en estructuras muy parecidas a las “*speckles*”, y son exportadas al núcleo de la célula hija (Lamond y cols. 1998; Mintz y cols. 1999).

Los GIC existen en células vegetales, animales y hongos y son muy abundantes en las células de vertebrados, en las que se agrupan en grandes cúmulos. En cefalocordados, invertebrados, plantas y hongos son menos abundantes (Jiménez y cols. 1989).

Medina y cols. (1989) realizaron estudios en células de cebolla y corroboraron que los GIC tienen el mismo tamaño, forma y propiedades citoquímicas que las descritas por Monneron y Bernhard (1969) en células animales.

Gránulos de Lacandonia

Los gránulos de *Lacandonia* son partículas RNP abundantes, no nucleolares; encontradas y descritas en el núcleo celular de la planta *Lacandonia schismatica*, son EDTA positivas; al microscopio electrónico se observan, formando cúmulos, cada gránulo tiene un diámetro aproximado de 32 nm (Jiménez-García y cols. 1992).

Agredano-Moreno y Jiménez-García (2000), mediante estudios de inmunolocalización ultraestructural (anticuerpo 3C5), demostraron que los GL poseen proteínas SR (familia de proteínas relacionadas con el *splicing* y *post-splicing*), característica compartida con los gránulos de los anillos de Balbiani (Alzhanova-Ericson y cols. 1996).

Estudios de hibridación ultraestructural *in situ* mostraron la presencia de ARN poly(A) en los GL, demostrando que son partículas enriquecidas en ARN mensajero maduro, tal como sucede en los gránulos pericromatinianos (Visa y cols. 1993; Agredano-Moreno y cols. 2001); los GL están relacionados con el metabolismo intranuclear del ARNm, su número varía durante el desarrollo de la flor, aumentan en la pre-antesis (estado de alta actividad transcripcional) y disminuyen en post-antesis (estado avanzado de maduración celular) (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000; Agredano-Moreno y cols. 2001), como ocurre en los GP durante la diferenciación celular en mamíferos y aves (Vázquez-Nin y cols. 1980; Zavala y cols. 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997).

Estudios de reconstrucción tridimensional generados mediante el análisis de imágenes estereopares ha permitido conocer la biogénesis ultraestructural de los gránulos de

lacandonia y sugerir que dichas partículas son elementos de una compleja estructura fibrogranular y que se originan del plegamiento de una o más fibras pericromatinianas (Gaona-López, 2008; Alonso-Murillo, 2008).

Los gránulos de Lacandonia se han identificado en diferentes taxa. Dentro de las angiospermas o plantas con flor en especies como *T. alata* (Jiménez-García, 1992), *T. brevistylis* (Jiménez-Ramírez, 2002), *Illicium floridanum* y *Pelargonium hortorum* (Guzmán-López, 2003) y *Soridium spruceanum* (Zamora-Acuña, 2006). Jiménez-Ramírez (2002) y Ramírez-Nuñez (2007) mostraron la presencia de estas partículas en dos especies de gimnospermas *G. biloba* y *Taxodium mucronatum*. Romero-Martínez (2010) mostró la presencia de los gránulos de Lacandonia en *Equisetum hyemale* L y *Adiantum capillus-veneris*, especies incluidas dentro de las pteridofitas cuyos orígenes se remontan a 300 y 370 millones de años respectivamente.

Briofitas

Las briofitas son el segundo grupo más importante de plantas, con cerca de 20,000 especies, en el medio terrestre. Generalmente son pequeñas y habitan en ambientes muy variados, desde cerca del nivel del mar hasta las elevaciones más altas, en las selvas o en los desiertos, pero su vida siempre está íntimamente ligada al agua en estado líquido. Su ciclo de vida incluye dos fases: el gametofito y el esporofito. Cada una de ellas tiene atributos morfológicos y biológicos que señalan a las briofitas como un grupo excepcional y muy importante en la evolución del reino vegetal. Tradicionalmente se les divide en tres categorías: 1) antocerotes, se conocen unas 100 especies en el mundo, su gametofito es un talo multiestratificado en el que cada célula contiene de 1 a 12 cloroplastos usualmente lenticulares. En el centro del cloroplasto hay un pirenoide. La superficie inferior del talo tiene numerosos rizoides unicelulares y cuenta con poros que se comunican con cámaras de

mucilago en las que se encuentran, con frecuencia, colonias de un alga del género *Nostoc*. Los anteridios y arquegonios se forman a partir de células superficiales dorsales; los anteridios están en cámaras mientras que la pared de los arquegonios es parte del tejido poco diferenciado del gametofito; 2) hepáticas, existen entre 6 500 a 7 000 especies, su gametofito puede ser taloide o folioso. El primero generalmente es postrado, como un listón, ramificado dicotómicamente, con una línea media y numerosos rizoides unicelulares en la superficie de contacto con el sustrato. La complejidad anatómica de las formas taloides es variable, desde unas cuantas capas de células hasta las que muestran cámaras aéreas, poros, tejido fotosintético especial y tejidos de almacén. Los órganos sexuales generalmente se forman en la superficie superior del talo, con frecuencia sobre ramas especializadas. Los esporofitos, por tanto se desarrollan en las partes elevadas que favorecen la diseminación de las esporas por el viento. Los gametófitos pueden producir estructuras asexuales de reproducción como las yemas o propágulos que se constituyen en estructuras en forma de copa o media luna con características aerodinámicas peculiares. Las gotas de lluvia se encargan de liberarlas y dispersarlas a sitios cercanos y 3) musgos, con cerca de 12,800 especies a nivel mundial, son el grupo más numeroso y diverso de las briofitas. El tallo puede ser erecto o postrado, de unos milímetros o centímetros de tamaño; su estructura interna, aunque simple, puede incluir un eje o cordón central y/o un sistema de conducción primitivo en algunos grupos. Además de los rizoides, los tallos de los musgos pueden tener estructuras fotosintéticas o de protección como pelos axilares, parafilios y pseudoparafilios. Las hojas están arregladas en forma espiral sobre el tallo, pero con frecuencia tienen otros arreglos; son uni o pluriestratificadas y sus células varían en tamaño, forma y ornamentación. Las hojas de muchos musgos tienen una costa, un nervio de longitud variable que puede prolongarse más allá de la lámina foliar en un mucrón o

pelo foliar hialino. La costa puede ser doble en algunos musgos tropicales y en algunos musgos, está cubierta por filamentos o lamelas. La anatomía de la costa también es compleja; consiste de varios tipos de células, incluyendo algunas de pared gruesa y otras de pared delgada que participan en la conducción de agua. Estudios indican que a pesar de estar relacionados, los grupos de briofitas son muy diferentes entre sí y no tienen un origen común, por lo que, deben ser clasificados en divisiones independientes (Delgadillo y Cárdenas, 1990).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los gránulos de Lacandonia son partículas ribonucleoproteicas que fueron encontradas y descritas por primera vez en el núcleo celular de la planta *Lacandonia schismatica*, una angiosperma tardíamente divergente dentro del proceso evolutivo. Análisis citoquímicos e inmunocitoquímicos posteriores permitieron concluir que los gránulos de Lacandonia contienen proteínas SR y ARN PoliA, por lo que se les ha relacionado directamente con el procesamiento del ARNm. Estudios ultraestructurales recientes revelaron que los gránulos de Lacandonia están presentes en *Ginkgo biloba*, una gimnosperma. En general se acepta que las briofitas son organismos a partir de los cuales evolucionaron las plantas vasculares - incluidas angiospermas y gimnospermas-. Dado que las briofitas son los antecesores de las traqueofitas en las cuales se ha descrito la presencia de los gránulos de Lacandonia, entonces es posible que este tipo de partículas nucleares se presenten en especies que divergieron tempranamente. Por ello, en el presente estudio se exploró la presencia de los gránulos de Lacandonia en tres especies de briofitas (una de cada taxón), para continuar en la búsqueda de la ubicuidad de estas partículas, así como inferir la función de los gránulos de Lacandonia en el procesamiento del mRNA dentro del reino vegetal.

HIPÓTESIS

Dado que las fibras pericromatinianas presentes en plantas y animales han sido relacionadas con sitios muy activos en la síntesis de ARN extranucleolar y que el enrollamiento de una o más de éstas forman un gránulo, entonces la biogénesis de los gránulos de Lacandonia ocurrirá a partir del enrollamiento de fibras pericromatinianas, lo que mostrará que este evento se conserva de manera igual o similar en los diferentes grupos de plantas a lo largo del proceso evolutivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de los gránulos de Lacandonia en tres especies del grupo briofita (una especie de cada taxón) *Marchantia polymorpha*, *Polytrichum juniperinum* y *Anthoceros punctatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar si las partículas nucleares están formadas por ribonucleoproteínas.
- Describir la forma, el tamaño y la distribución de los gránulos de Lacandonia en las briofitas.
- Analizar si los gránulos de Lacandonia son parte de una estructura fibro-granular, mediante un análisis tridimensional, generado a partir de imágenes estereopares.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Parque Nacional de los Dinamos, Magdalena Contreras, México, D.F; se obtuvieron especímenes jóvenes de cada una de las especies del grupo briofita. Las especies estudiadas fueron *Marchantia polymorpha* (hepáticas), *Polytrichum juniperinum* (musgos) y *Anthoceros punctatus* (antoceros). (Figs. A, B y C).



A) *M. polymorpha*



B) *P. juniperinum*



C) *A. punctatus*

Secciones de esporofito de 1-3 mm³, de cada una de los especímenes, fueron fijados a temperatura ambiente durante 24 horas en una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (pH 7). Ejemplares de cada especie fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% por 24 horas, se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos cada una; se deshidrataron en una serie de etanoles (50, 70, 80, 90 y 96%), de 10 minutos en cada concentración y tres lavados de 10 minutos en la solución de etanol al 100%; la muestra se lavó 3 veces con óxido de propileno (Sigma-Aldrich) por 10 minutos; luego se pasó a una mezcla (1:1) de óxido de propileno-resina Epon (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU.) durante toda la noche; las muestras se dejaron destapadas a temperatura ambiente para la evaporación del óxido de propileno; se

incluyeron en resina Epon de dureza media y se colocaron en una estufa a 60 °C para su polimerización (de 24 a 48 horas) siguiendo la metodología de Vázquez-Nin y Echeverría, (2000). Los especímenes fueron cortados con un ultramicrotomo (Ultracut-R, Leica Microsystems), utilizando cuchillas de vidrio (LKB Instruments, Londres).

De todos los ejemplares se obtuvieron cortes semifinos (200-300 nm de grosor) y se tiñeron con azul de toluidina, el objetivo fue realizar una exploración preliminar y elegir la zona de interés para observar al microscopio electrónico de transmisión.

Los cortes ultrafinos que fueron post-fijados con tetraóxido de osmio fueron contrastados con uranilo-plomo (Hayat, 1975).

Algunas muestras de cada especie no recibieron post-fijación para determinar la presencia de ribonucleoproteínas y se utilizó la metodología de Bernhard (1969). En breve, los cortes se colocaron en una gota de una solución de acetato de uranilo al 5% (E. Merck, Darmstadt, Alemania) dentro de una cámara húmeda con hidróxido de sodio (Técnica química, México), durante 3 minutos; las rejillas fueron lavadas con goteo de agua destilada. Para remover preferencialmente el metal unido a la cromatina, los cortes se colocaron en una gota de una solución de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.2 M en agua destilada pH 7, durante 18 min, fueron enjuagados por goteo de agua destilada y se dejaron secar en una caja de Petri a temperatura ambiente. Los cortes se contrastaron con citrato de plomo al 0.3 % (E. Merck) durante 3 minutos, fueron lavados por goteo y se les dejó secar en una caja de Petri.

Se realizó la técnica específica para ADN (NaMaUr) para las tres especies estudiadas (Testillano y cols. 1991). Fragmentos de esporofito se fijaron en glutaraldehído al 3% en

amortiguador de cacodilatos de sodio 0.025 M, a temperatura ambiente durante 6 horas. Los fragmentos fueron lavados tres veces durante 10 minutos, en el mismo amortiguador. Se realizó una segunda fijación en una mezcla que contenía paraformaldehído al 4% e hidróxido de sodio 0.5 N, durante 24 horas. Los fragmentos fueron lavados nuevamente tres veces, durante 10 minutos, ahora con agua destilada. Los fragmentos fueron colocados en una solución de ácido acético 3 veces, durante 10 minutos cada una. Se deshidrataron en una serie de metanol diluido en agua destilada (50, 70, 80, 90 y 96%), durante 10 minutos en cada concentración. Los fragmentos fueron incubados a temperatura ambiente en una mezcla de metanol absoluto/anhídrido acético (5:1), durante 48 horas. Al término de la incubación se realizó un lavado de 10 minutos en metanol absoluto. Los fragmentos fueron contrastados con una solución de acetato de uranilo 8% (disuelto en metanol) a 60 °C, durante 2 horas; se lavaron dos veces en metanol absoluto, por 10 minutos cada una. Las muestras fueron nuevamente lavadas dos veces, durante 10 minutos cada una, ahora en óxido de propileno. Se colocaron los fragmentos en una mezcla de resina Epon/óxido de propileno (1:1), durante 24 horas. Las muestras se colocaron a temperatura ambiente para la evaporación del óxido de propileno durante una noche y se incluyeron en resina Epon. Fueron colocados en una estufa a 60 °C para su polimerización.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo 1010 a 80 kV.

RESULTADOS

La figura 8 muestra un corte transversal del esporofito de *Marchantia polymorpha*, en la que se observa gran cantidad de tejido parénquimatoso. Algunas zonas tienen mayor cantidad de núcleos, las cuales fueron elegidas para su observación al microscopio electrónico.

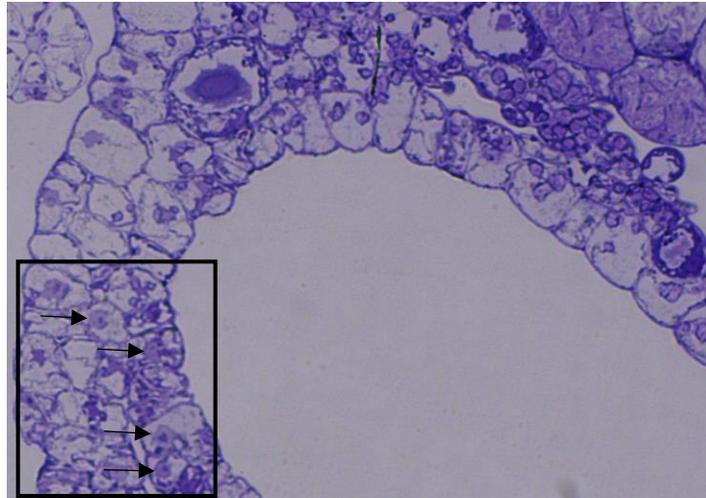


Fig. 8. Corte transversal de *M. polymorpha*, el recuadro indica una zona con mayor cantidad de núcleos y las flechas señalan algunos de ellos.

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión de células nucleadas de *M. polymorpha*, contrastadas con uranilo-plomo, muestran que sus núcleos presentan escasos grumos de cromatina dispersos en el nucleoplasma (Fig. 9A), lo que fue corroborado con la técnica específica para ADN (Fig. 9B).

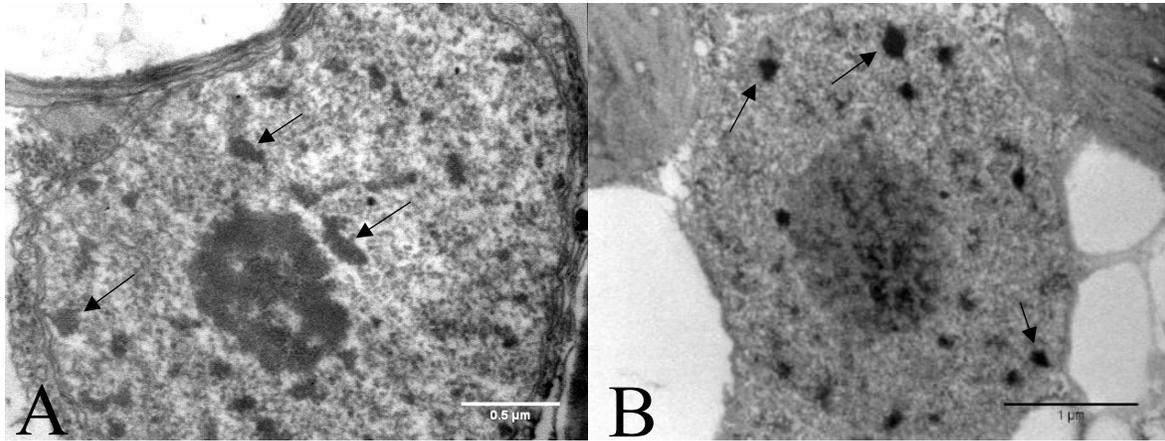


Fig. 9. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *M. polymorpha*. A) Contraste convencional (acetato de uranilo y citrato de plomo) y B) Micrografía electrónica de transmisión de *M. polymorpha*, contraste específico para ADN (NaMaUr). Las flechas indican grumos de cromatina.

A mayor aumento, los núcleos de *M. polymorpha* mostraron material fibro-granular escaso en el nucleoplasma y algunos grumos de cromatina compacta asociados a gránulos (Figs. 10A-10B).

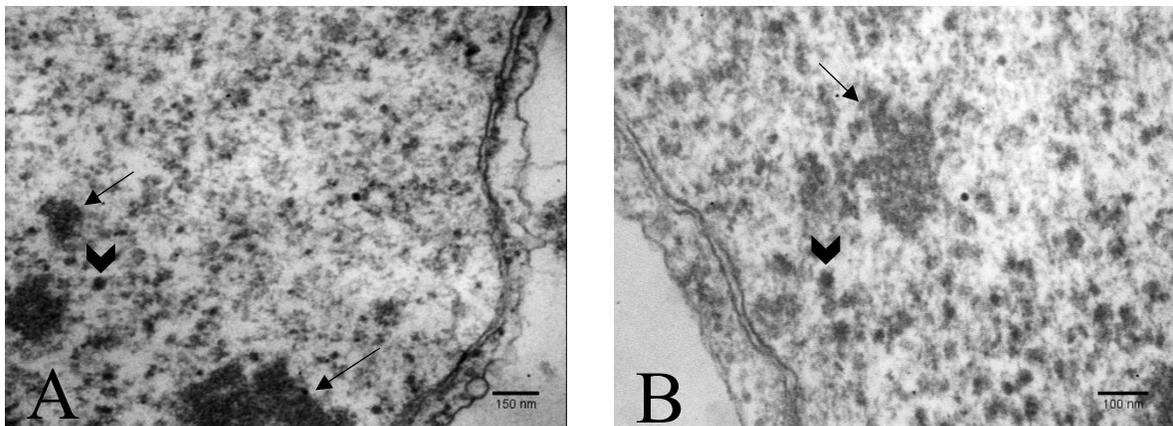


Fig. 10. A) y B) Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *M. polymorpha*. Contraste convencional (acetato de uranilo y citrato de plomo). Las flechas indican grumos de cromatina y las cabezas de flecha señalan partículas “posiblemente gránulos de Lacandonia”.

Con el uso de la técnica preferencial para RNPs en *M. polymorpha* se observa la presencia de partículas de 32 nm asociadas a fibras pericromatinianas (Figs. 11A y 11B).

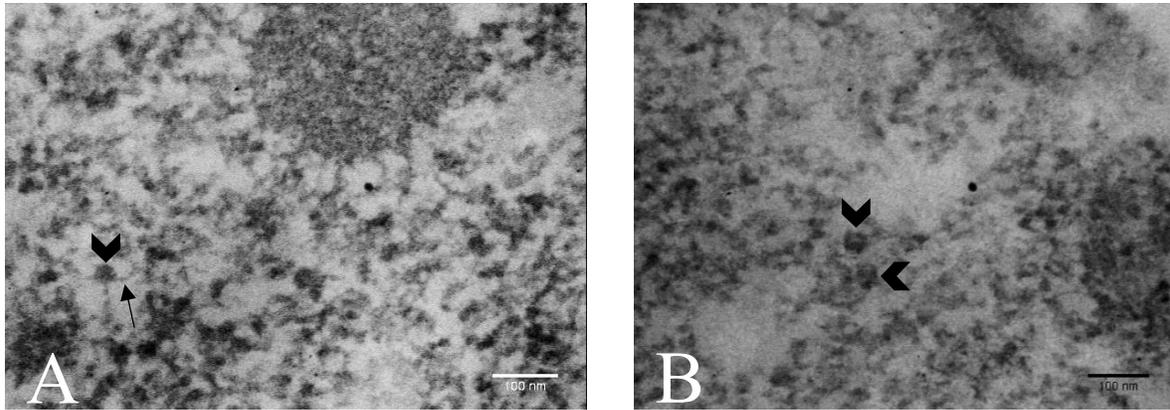


Fig. 11. A) y B) Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *M. polymorpha* contrastado con la técnica preferencial de Bernhard para RNP. La cabeza de flecha muestra los gránulos y la flecha indica continuidad que se observa con fibras pericromatinianas.

La figura 12 muestra la sección transversal del esporofito de *Polytrichum juniperinum*. En la región central se observa la columela formada por tejido parenquimatoso la que tiene función de soporte. En el exterior se observan células grandes (formadoras de esporas) y por último zonas vacías llamadas espacios aeríferos.

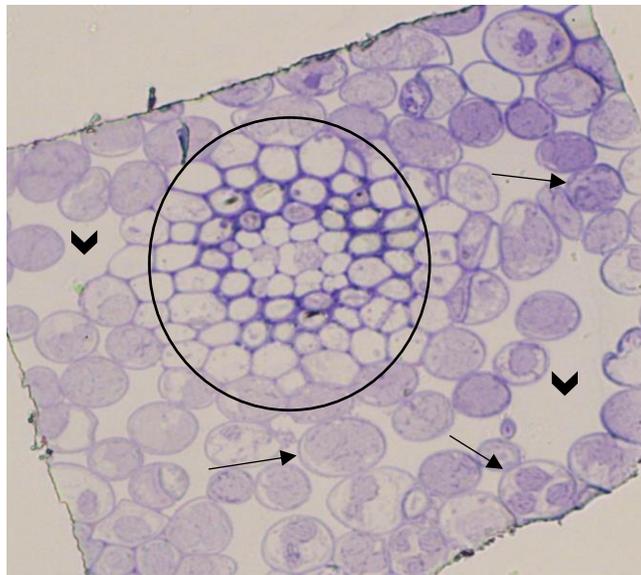


Fig. 12. Corte transversal de esporofito de *P. juniperinum*. El círculo muestra la columela, las flechas indican las células formadoras de esporas y las cabezas de flecha señalan los espacios aeríferos.

Las micrografías electrónicas de transmisión de núcleos de *P. juniperinum*, contrastados con uranilo-plomo, muestran que la cromatina es poco evidente (Fig. 13A). En los cortes contrastados con la técnica específica para ADN se observan los grupos de cromatina los que presentan un patrón de distribución reticulado (Fig. 13B).

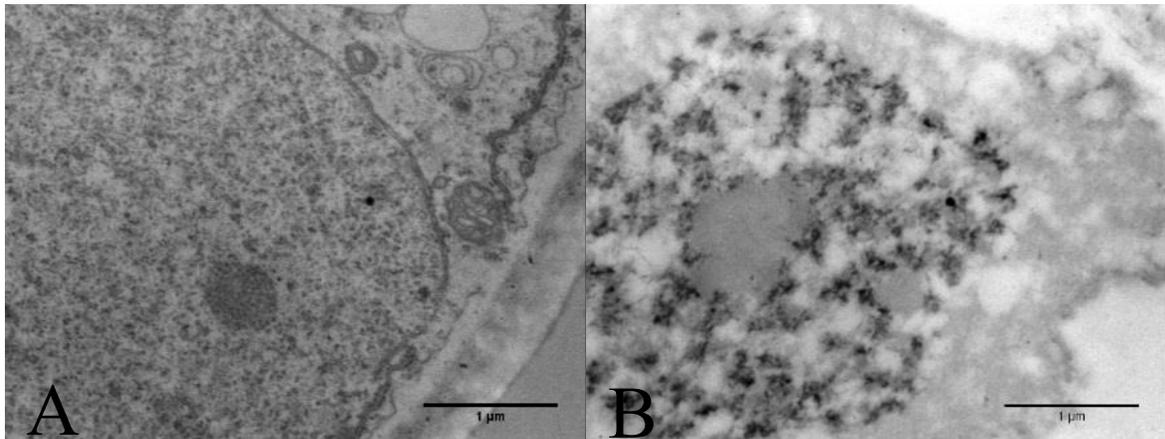


Fig. 13. A) Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *P. juniperinum*. Contraste convencional (acetato de uranilo y citrato de plomo) y B) Micrografía electrónica de transmisión de *P. juniperinum*. Contraste específico para ADN, las zonas electrodensas indican grupos de cromatina.

A mayor aumento en los núcleos de *P. juniperinum* se observa poca cantidad de material fibro-granular y algunos gránulos aislados en la región peri e intercromatiniana, cuyo tamaño es el doble del de un ribosoma (32-34 vs. 15-20 nm) (Figs. 14A y 14B).

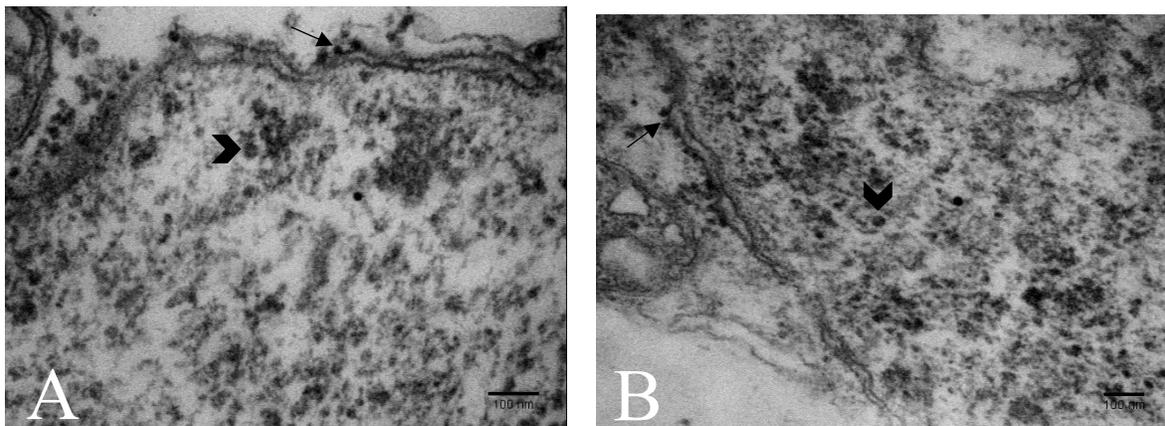


Fig. 14. A) y B) Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *P. juniperinum*. Contraste convencional (acetato de uranilo y citrato de plomo). Cabezas de flecha indican gránulos y las flechas señalan ribosomas.

El contraste de núcleos de *P. juniperinum* con la técnica preferencial para RNPs muestra la presencia de partículas solitarias de 32 nm, ubicadas dentro de la región peri e intercromatiniana, asociadas a fibras pericromatinianas (Figs. 15A y 15B).

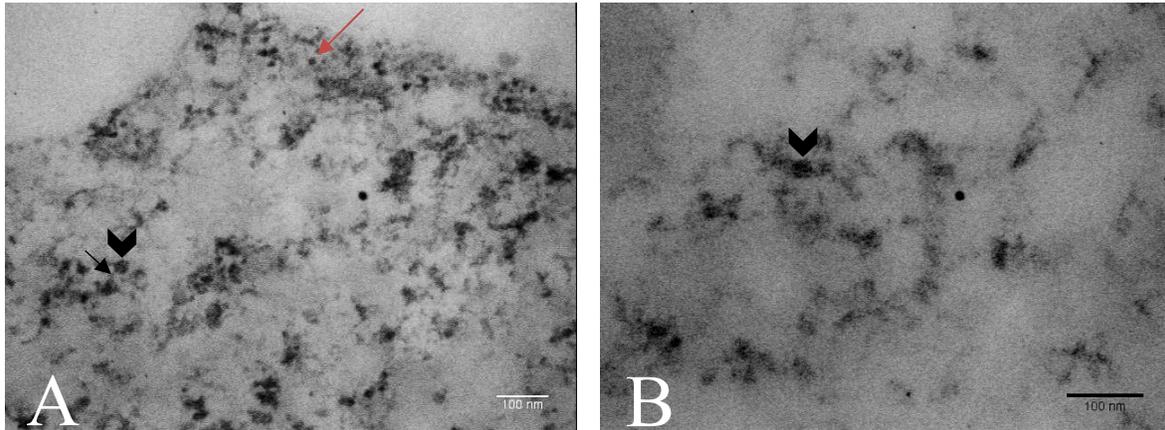


Fig. 15. A) y B) Micrografías electrónicas de transmisión de dos núcleos de *P. juniperinum* contrastados con la técnica preferencial de Bernhard para RNP. La cabeza de flecha muestra un gránulo, la flecha negra indica continuidad con fibras pericromatinianas y la flecha roja señala ribosomas los cuales son aproximadamente de la mitad del tamaño que un gránulo.

La figura 16 muestra un corte transversal de *Anthoceros punctatus*. En la parte central (columela) se observa un grupo de seis células. Las células de mayor tamaño fuertemente teñidas corresponden a esporas en diferentes estadios de maduración.

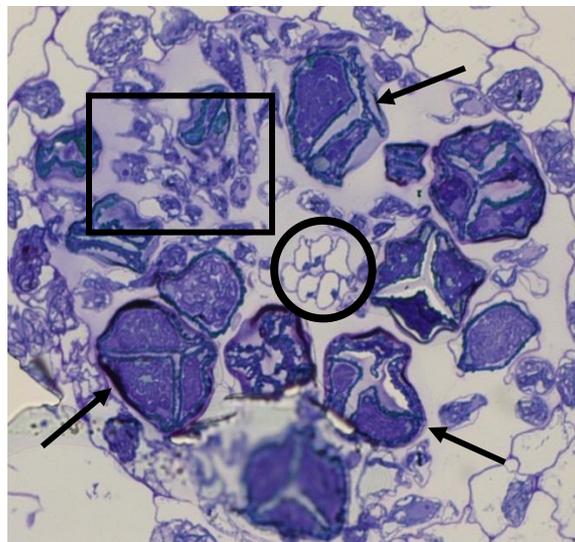


Fig. 16. Sección transversal de esporofito de *A. punctatus*, el círculo encierra las células de la columela, el rectángulo las células nucleadas y las flechas indican las esporas en diferentes estadios de maduración.

En los núcleos de *A. punctatus* contrastados con uranilo-plomo no se pudo distinguir la cromatina compacta (Fig. 17A). En cambio, en las células contrastadas con la técnica específica para ADN se observan grumos de cromatina distribuidos en el nucleoplasma (Fig. 17B).

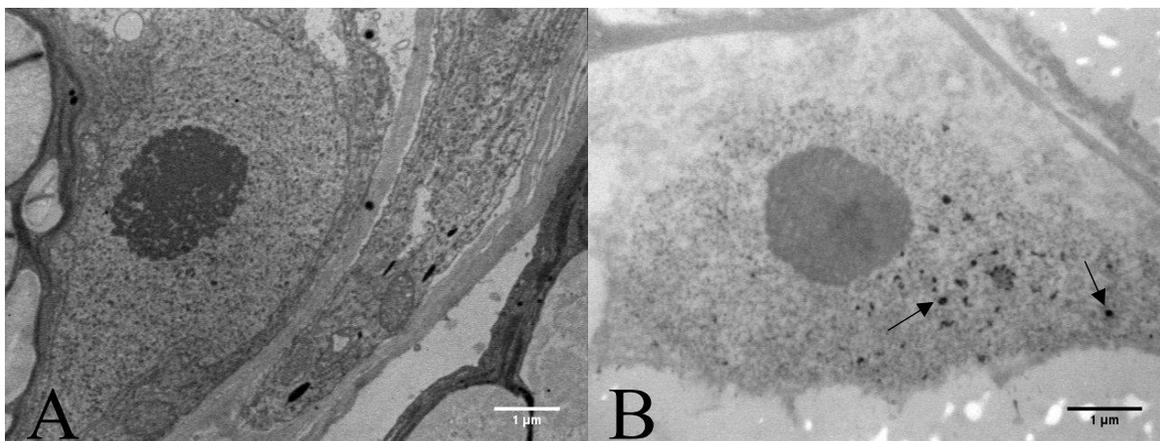


Fig. 17. A) Micrografía electrónica de transmisión de *A. punctatus* contrastada con uranilo-plomo y B) Célula contrastada específicamente para ADN (NaMaUr). Las flechas indican grumos de cromatina.

A mayor aumento las micrografías electrónicas de transmisión con contraste uranilo-plomo, de núcleos de células de *A. punctatus*, muestran escaso material fibro-granular (Fig. 18A) y pequeños grumos de cromatina (Fig. 18B).

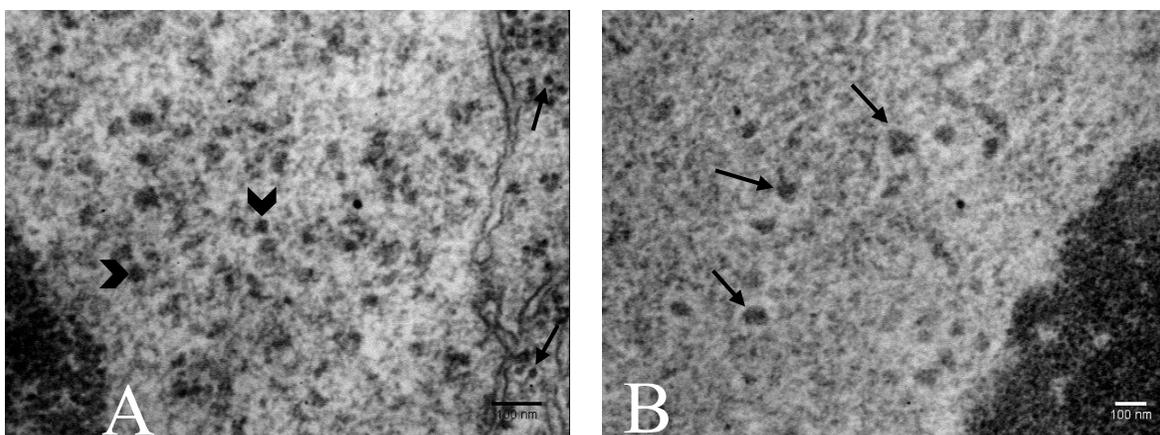


Fig. 18. A) Micrografía del núcleo de una célula de *A. punctatus* contrastada con acetato de uranilo - citrato de plomo, donde se muestran gránulos (cabeza de flecha) y ribosomas (flecha) y B) Las flechas señalan pequeños grumos de cromatina.

En células nucleadas de *A. punctatus* contrastadas con la técnica preferencial para RNPs se observan gránulos solitarios de 32 nm asociados a fibras (Figs. 19A y 19B).

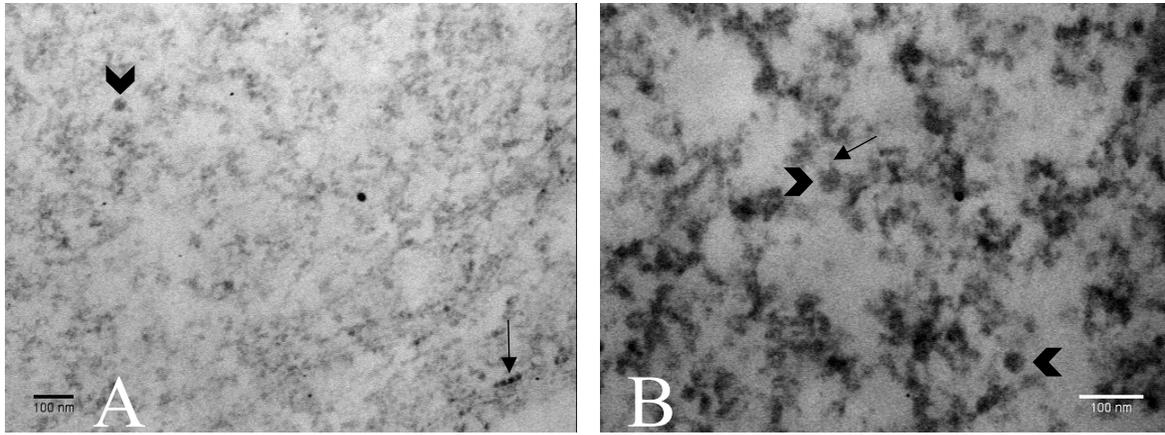


Fig. 19. A) Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *A. punctatus* contrastado con la técnica preferencial de Bernhard para RNPs. La cabeza de flecha muestra un gránulo y se hace el comparativo con un ribosoma (flecha) y B) La cabeza de flecha señala gránulos solitarios en asociación con fibras pericromatinianas (flecha).

DISCUSIÓN

Los análisis citoquímicos de las partículas intranucleares en los núcleos de las tres especies de briofitas estudiadas muestran que los gránulos están formados por ribonucleoproteínas ya que son positivos con la técnica regresiva EDTA (Bernhard, 1969), característica de los gránulos de *Lacandonia*.

Las briofitas son plantas no vasculares que incluyen cerca de 24000 especies agrupadas en más de 1000 géneros; pertenecen al subreino Embriophyta –que también incluye a las plantas vasculares- porque forma un embrión que se desarrolla a partir del cigoto, producto de la fusión de dos células sexuales. Son plantas pequeñas que se clasifican en tres grupos: hepáticas, antoceros y musgos. Las briofitas tienen un ciclo de vida en el que alternan dos generaciones, el gametofito y el esporofito. Según Delgadillo (1990) las dos generaciones son fases claramente diferentes en forma, función y dotación cromosómica: 1) gametofito

fotosintético, 2) esporofito dependiente de gametofito y 3) gametofito haploide y esporofito diploide; estas características junto con el registro fósil son evidencia que permite ubicar a las briofitas como ancestro directo de las traqueofitas.

Según Renzaglia y cols. (2000) el desarrollo ontogénico del esporofito en briofitas provoca que la disposición de las células sea irregular y sin organización espacial evidente. Sin embargo presentan estructuras y tipos celulares característicos como plastidios, células formadoras de esporas, segmentación incompleta de las cámaras anteridiales, saco esporífero, tétrada de esporas, cámara en la base de la cápsula, columela y parénquima. Estas características se observan en la sección transversal del esporofito de *A. punctatus* y *P. juniperum*. En las tres especies de briofitas estudiadas se notó escasa cantidad de núcleos en comparación con las plantas vasculares, el tamaño de ellos varía entre 3 y 5 µm. En *M. polymorpha* y *A. punctatus* la cantidad de cromatina es escasa y no tiene un patrón de distribución específico; mientras que en *P. juniperum* la cromatina es evidente y tiene un patrón de distribución reticulado.

Los gránulos de Lacandonia fueron considerados como una característica exclusiva de la especie *L. schismatica* una angiosperma que divergió tardíamente (100-110 m. a.) (Jiménez-García y cols. 1992). Jiménez-Ramírez (2002) y Ramírez-Núñez (2007) mostraron la presencia de éstas partículas en dos especies de gimnospermas, plantas que aparecieron hace aproximadamente 250-300 m.a. Posteriormente, Romero-Martínez (2010) identificó la presencia de los gránulos de Lacandonia en dos especies incluidas dentro de las pteridofitas cuyos orígenes se remontan a 300-370 millones de años. En nuestro estudio mostramos la presencia de los gránulos de Lacandonia en tres especies de briofitas,

organismos considerados antecesores de las traqueofitas que aparecieron aproximadamente hace 420 m.a.

En los núcleos de las tres especies de briofitas estudiadas observamos partículas ribonucleoproteicas de tipo granular de 32 nm de diámetro que se asocian con grupos de cromatina compacta y que tienen el doble de tamaño de un ribosoma. Los gránulos se hallan solitarios, se distribuyen en la región peri e intercromatiniana y están asociadas a FPC.

Según Puvion y Moyne (1981) en células de mamíferos los GPC y GIC presentan una continuidad estructural con las FPC, por lo que se acepta que los GPC, GIC y los gránulos de *Lacandonia* se forman a partir del plegamiento de las FPC. Lo anterior explica la variación en el tamaño entre los diferentes gránulos de *Lacandonia*, en donde la forma madura que no está asociada a una FPC, es una partícula aislada de 32 nm de diámetro (Jiménez-Ramírez y cols. 2002).

En los núcleos de las briofitas *M. polymorpha*, *P. Juniperinum* y *A. punctatus* identificamos gránulos *Lacandonia* que se distribuyen en el espacio peri e intercromatiniano, semejante a lo descrito por Jiménez-García y cols. (1992) en *L. Schismatica*. La distribución de los gránulos de *Lacandonia* sería consecuencia de la función que cumplen al almacenar ARN mensajero maduro y ser reservorio de proteínas SR, ya que los gránulos maduros deben migrar de la región pericromatiniana hacia la región intercromatiniana en espera de ser exportados al citoplasma, como ocurre en otras partículas ribonucleoproteicas intranucleares como son los GPC y los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y Jiménez García, 2000).

Jiménez-García y cols. (1992) y Jiménez-Ramírez y cols. (2002) identificaron la presencia de grandes cúmulos de gránulos de Lacandonia en *L. schismatica* y *G. biloba*, respectivamente. En los núcleos de las tres especies de briofitas estudiadas por nosotros, observamos que los gránulos de Lacandonia son solitarios y no forman cúmulos, lo cual se explicaría porque el número de gránulos de Lacandonia tiene relación directa con el nivel de transcripción celular (Agredano-Moreno, 2001). Asimismo, durante la mitosis se reduce la transcripción como consecuencia de que se disgregan las maquinarias del procesamiento del ARN, lo que se refleja en la disminución del número de los gránulos presentes (Ramírez-Núñez, 2007).

Tomados en conjunto, los estudios de Jiménez-Ramírez (2002), Ramírez-Núñez (2007), Romero-Martínez (2010) y el presente estudio muestran que la presencia de los gránulos de Lacandonia constituye un carácter conservado a lo largo de la evolución de las plantas y que no son una característica exclusiva dentro de una especie que mostró una innovación morfológica dentro las angiospermas, como lo es *Lacandonia schismatica*.

Dado que los gránulos de Lacandonia almacenan ARN mensajero maduro y contienen elementos de la maquinaria del *splicing* inferimos que el procesamiento del ARN mensajero se ha conservado, por lo menos, hace 420 m.a. a través de estas partículas.

CONCLUSIONES

Las partículas intranucleares observadas en las tres especies de briofitas están formadas por ribonucleoproteínas, por lo que, podemos afirmar que los gránulos de Lacandonia están presentes en los núcleos de las briofitas.

Los gránulos se forman a partir del plegamiento de una o más FPC y se distribuyen en el espacio peri e intercromatiniano.

Los resultados sugieren que los gránulos de Lacandonia contribuyen a la organización espaciotemporal de los factores que participan en el procesamiento de ARN mensajero en los subcompartimentos nucleares.

Los factores que participan en el procesamiento del ARN mensajero está presente en el reino vegetal desde al menos hace 420 m.a.

PERSPECTIVAS

Buscar si los factores que participan en el procesamiento del ARN mensajero están presentes en grupos de algas verdes (carofíceas), que representan linajes de los cuales descienden las plantas terrestres.

Buscar características citoquímicas de los gránulos de Lacandonia.

Analizar si el número de gránulo de Lacandonia depende del tipo de célula y del estado funcional.

REFERENCIAS

Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C. y Vázquez-Nin, G.H. (1994). Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. Biol. Cell. 82:177-184.

Agredano-Moreno, L.T. y Jiménez-García, L.F. (2000). New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. Biol. Cell. 92:71–78.

Agredano-Moreno, L.T., González-Jiménez, M.A., Segura-Valdez, M.L., Ublado, E., Ramos, C.H., Martínez, E. y Jiménez-García, L.F. (2001). Further ultrastructural characterization of the intranuclear ring-shaped bodies of the plant *Lacandonia schismatica*. J. Struct. Biol. 136:1-6.

Agredano-Moreno, L.T. (2001). Los gránulos de *Lacandonia*: caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y asilamiento de una fracción enriquecida en gránulos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc, Nueva York y Londres.

Alonso-Murillo, C. D. (2008). Análisis ultraestructural de la biogénesis de los gránulos de *Lacandonia* en “Ahuehuate” (*Taxodium mucronatum*). Trabajo de Investigación. Especialista en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM.

Alzhanova-Ericson, A, Sun, X. y Visa, N. (1996). A protein of the SR family of *splicing* factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore. *Genes Dev.* 10:2881-2893.

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

Beven, A.F., Simpson, G.G., Brown, J.W.S. y Shaw, P. (1995). The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J. Cell Sci.* 108:509-518.

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

Carrión, J. y Cabezudo, B. (2003). Perspectivas recientes en evolución vegetal. *Anales de Biología.* 25:163-198.

Clemson, C.M. y Lawrence, J.B. (1996). Multifunctional compartments in the nucleus: insights from DNA and RNA localization. *J. Cell Biochem.* 62:181-190.

Cremer, T., Küpper, K. Dietzel, S. y Stanislav, F. (2004). Higher order chromatin architecture in the cell nucleus on the way from structure to function. *Biol. Cell.* 96:555-567.

Chubb, J.R. y Bickmore, W.A. (2003). Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell.* 112:403-406.

Daneholt, B. (1999). Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr. Biol.* 9:412-415.

Daneholt, B. (2001). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. PNAS. 98:7012-7017.

Daskal, Y. (1981). "Perichromatin granules". En: The Cell Nucleus. H. Busch (Eds.), Academic Press, New York, pp. 117-137.

Delgadillo, C.M. y Cárdenas, M.A. (1990). Manual de briofitas. Segunda edición. Cuadernos 8. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F. 135 p.

Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo CDLXXXVIII Núm. 10. (1994). México.

Dundr, M., y Misteli, T. (2001). Functional architecture of the cell nucleus. Biochem. J. 356:297-310.

Eils, R., Gerlich, D., Tvarusko, W., Spector, D.L. y Misteli, T. (2000). Quantitative imaging of premRNA *splicing* factors in living cells. Mol. Biol. Cell. 11:413-418.

Eran, M. y Misteli, T. (2005). *Splicing* Misplaced. Cell. 122:317-325.

Fakan, S. y Bernhard, W. (1971). Localization of rapidly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. Exp. Cell Res. 99:155-164.

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

Falcón-Bárceñas, T. (2002). Estudio de los gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis por microscopía electrónica de transmisión (MET). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Fragoso-Soriano, R.J., Vázquez-López, C., Pérez-García, B. y Jiménez-García, L.F. (2009). Atomic force microscopy imaging of thin sections of *Lacandonia* granules. *J. Scann. Probe Microsc.* 4:73–77.

Fragoso-Soriano, R.J., Jiménez-García, L.F. y Vázquez-López, C. (2011). AFM study of cellular structure organelles of *Lacandonia schismatica* and visualization of images using the error signal. *J. Adv. Microsc. Res* 6:1–6.

Gallie, D.R. (1991). The cap and poly (A) tail function synergistically to regulate mRNA translation efficiency. *Genes Develop.* 5:2108-2116.

Gómez-Eichelman, M.C. y Camacho-Carranza, R. (1995). El nucleóide bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37:281-290.

Goromykin, V.V. y Hellwig, F.H. (2005). Evidence for the most basal split in land plants dividing bryophyte and tracheophyte lineages. *Plant Syst. Evol.* 254:93–103.

Grande, M.A., Van der Kraan, I., Jong, L. y Van Driel, R. (1997). Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* 110:1781-1791.

Gaona-López, C. (2008). Análisis Tridimensional de los Gránulos de *Lacandonia* en Núcleo Celular de *Ginkgo biloba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Guzmán-López, A.G. (2003). Estudio del núcleo de las angiospermas *Illicium floridanum* y *Pelargonium hortorum* por microscopía de luz, microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Hayat, M.A. (1975). Positive staining for electron microscopy. Van Nostrand Reinhold, New York.

Hernandez-Verdun, D. (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem. Cell Biol.* 125:127-137.

Jiménez-García, L.F. (1988). El nucléolo: relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.

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

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

Jiménez-García, L.F., Reynoso, R., Fragoso, R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L. González.-Moreno, S., Ramos, C.H. y Martínez, E. (1998). Biología molecular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. México.* 62:5-14.

Jiménez-García, L.F. y Fragoso-Soriano, R. (2000). Atomic Force of the Cell Nucleus. *J. Struct. Biol.* 129:218-222.

Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L., Segura-Valdez, L. y Jiménez-García, L.F. (2002). *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. *Biol. Cell.* 94:511-518.

Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. Pearson Education. México.

Jiménez-García, L.F., Martínez-Lara, R., Chavarria-Gil, I., Zamora-Cura, A.L., Salcedo-Alvarez, M., Agredano-Moreno, L.T., Moncayo-Sahagún, J.J. y Segura-Valdez, M.L. (2007). *Biología celular del splicing*. Mensaje Bioquímico. XXXI.

Karol, K.G., Mccourt, R.M., Cimino, M.T. y Delwiche, C.F. (2001). The closest living relatives of land plants. *Science*. 294:2351–2353.

Kellogg, E.A. (2004). Evolution of developmental traits. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:92-98.

Kenrick, P. y Crane, P. (1997). *The origin and early diversification of land plants: A cladistic study*. Smithsonian Institution Press, Washington DC.

Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA *splicing*. *Annu. Rev. Biochem.* 65:367-409.

Lamond, A.I. y Earnshaw, W.C. (1998). Structure and function in the cell nucleus. *Science*. 280:547-553.

Lamond, A.I. y Sleeman, J.E. (2003). Nuclear substructure and dynamics. *Curr. Biol.* 13:21-24.

Lamond, A.I. y Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:605–612.

Lopato, S. Mayeda, A., Krainer, A.R. y Barta, A. (1996). Pre-mRNA *splicing* in plants: characterization of Ser/Arg *splicing* factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:3074-3079.

Lorković, Z.J. y Barta, A. (2004). Compartmentalization of the *splicing* machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci.* 12:564-568.

Márquez-Guzmán, J., Engleman, E.M., Martínez-Mena, A., Martínez, E. y Ramos, C.H. (1989). Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard* 76, 124–127.

Marshall, W.F. (2002). Order and disorder in the nucleus. *Curr. Biol.* 12:185-192.

Martínez, E. y Ramos, C.H. (1989). Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 76:128–135.

Medina, M.A., Moreno Díaz de la Espina, S., Martín, M. y Fernández-Gómez, M.E. (1989). Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell.* 67:331-339.

Mintz, P.J., Patterson, S.D., Neuwald, A.F., Spahr, C.S. y Spector, D.L. (1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO. J.* 18:4308-4320.

Misteli, T. y Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell.* 3:697-705.

Misteli, T. Caceres, J.C. y Spector, D.L. (1997). The dynamics of a premRNA *splicing* factor in living cells. *Nature.* 387:523-527.

Monneron, A. y Bernhard, W. (1969). The fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27:266-288.

Moyne, G., Nash, R.E. y Puvion, E. (1977). Perichromatin granules and other nuclear components in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cell.* 6:5-16.

Puvion, E. y Moyne, G. (1981). In situ localization of RNA structures. In: *The cell nucleus.* (Busch H. eds.), Academic Press, New York, pp. 59-115.

Puvion, E. y Bernhard, W. (1975). The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. *J. Cell Biol.* 67:200-214.

Qiu, Y.L., Li, L.B., Wang, B.Z., Chen, D., Knoop, V., Groth-Malonek, M. y Dombrowska, O. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 103:15511–15516.

Ramírez-Núñez, A.L. (2007). *Biología celular de los gránulos de Lacandonia.* Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Renzaglia, K.S., Duff, R.J., Nickrent, D.L. y Garbary, D.J. (2000). Vegetative and reproductive innovations of early land plants: Implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences.* 355:769–793.

Romero-Martínez, I. (2010). *Análisis ultraestructural de la biogénesis de los gránulos de Lacandonia en equisetos (*Equisetum hyemale* L) y helechos (*Adiantum capillus-veneris*).* Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Sanford, J. R. y Cáceres, J.F. (2004). Pre-mRNA splicing: life at the centre on the central dogma. *J. Cell Sci.* 117:6261-6263.

Semarnat. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.

Shen, H., Kan, J.L.C. y Green, M.R. (2004). Arginine-serine-rich domains at splicing enhancers contact the branchpoint to promote pre-spliceosome assembly. *Mol. Cell.* 367-376.

Spector, D.L. (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72:573-608.

Spector, D. L. (2001). Nuclear Domains. *J. Cell Sci.* 114:2891-2893.

Spector, D.L., Goldman, R.D. y Leinward, A.L. (1998). *Cells a laboratory manual, subcelular localization of genes and their products.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Swift, H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. on structure and function of Genetics Elements.* 12:134-150.

Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.A., Tandler, C.J. y Risueno, M.C. (1991). A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1427-1438.

Vázquez Nin, G.H. y Bernhard, W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36:842-60.

Vázquez-Nin, G.H. y Echeverría, O. (1996). The polytene nucleus in morphological, cytochemical and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40:7-16.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Molina, E. y Fragoso, J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35:221-228.

Vázquez-Nin, G.H., Ortega-Rangel, J.A. y Echeverría, O.M. (1980). Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell.* 39:143-146.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Fakan, S., Leser, G. y Martín, T. (1990). Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma.* 99:44-51.

Vázquez-Nin, G.H., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Guzmán, A., Coeto-Barona, G. y Nava-Ruíz, C. (1999). Correlation of the changes of the frequency of the perichromatinian granules with the RNA content of the interchromatin region of uterine cells in normal and ovariectomized rats. A high resolution *In Situ* hybridization and stereological study. *Biol. Cell.* 91:109-115.

Vázquez-Nin, G.H. y Echeverría, O.M. (2000). Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, México, 168 p.

Verschure, P.J. (2004). Positioning the genome within the nucleus. *Biol. Cell.* 96:569-577.

Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Harper, F. y Bachellerie, J.P. (1993). Intranuclear distribution of Poly (A)⁺ RNA determined by electron microscope in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 208:19-34.

Wang, Y., Ma, M., Xiao, X. y Wang, Z. (2012). Intronic *splicing* enhancers, cognate *splicing* factors and context-dependent regulation rules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:1044–1052.

Wassef, M, Burglen, J. y Bernhard, W. (1979). A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69:121-133.

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

Will, L. y Lührman, R. (2015). Spliceosome structure and function. Cold. Spring. Harb. *Perspect. Biol.*

Yang, Y. y Walsh, E. (2005). Spliceosome-Mediated RNA trans-splicing. *Molecular therapy.* 12:1006-1012.

Zaidi, S.K., Young, D.W., Choi, E.J. y Pratap, J. (2005). The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *Europ. Molec. Biol. Org.* 6:128-133.

Zamora Cura, A. L. (2006). Estudio del núcleo Interfásico de *Soridium spruceanum* Miers por microscopía de luz, electrónica y de fuerza atómica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Zavala, G. y Vázquez-Nin, G.H. (1997). Changes of ribonucleoproteic structures of embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation. *Biol. Cell.* 89:245-255.

Zavala, G., Aguilar, X., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M. y Vázquez-Nin, G.H. (1992). Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during differentiation of muscle cells in the chick embryo. *Biol. Cell.* 76:159-165.

Zimber, A., Nguyen, Q. y Gespach, C. (2004). Nuclear bodies and compartments. Functional roles and cellular signaling in health and disease. *Cell Signaling.* 16:1085-1104.