



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA BIOGÉNESIS  
DE LOS GRÁNULOS DE *LACANDONIA* EN EQUISETOS  
(*Equisetum hyemale* L) Y HELECHOS (*Adiantum capillus-  
veneris*)

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**IVONNE ROMERO MARTÍNEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO, D.F.

junio 2010



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA BIOGÉNESIS  
DE LOS GRÁNULOS DE *LACANDONIA* EN EQUISETOS  
(*Equisetum hyemale* L) Y HELECHOS (*Adiantum capillus-  
veneris*)

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**IVONNE ROMERO MARTÍNEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO, D.F.

junio 2010



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/409/09

ASUNTO: Oficio de Jurado

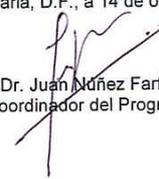
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (a) alumno (a) ROMERO MARTINEZ IVONNE con número de cuenta 94244274 con la tesis titulada "Análisis Ultraestructural de la Biogénesis de los Gránulos de *Lacandonia* en Equisetos (*Equisetum hyemale* L.) y Helechos (*Adiantum capillus-veneris*).", realizada bajo la dirección del (la) DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA:

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN  
Vocal: DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO  
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA  
Suplente: DRA. JOSEFINA CORTES ESLAVA  
Suplente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

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

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de octubre de 2009.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/grf\*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme otorgado la oportunidad de ingresar y finalizar esta maestría, así como a la Facultad de Ciencias (FC) de la UNAM por la formación académica y personal otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 202740, por el significativo apoyo económico recibido ininterrumpidamente durante los 4 semestres de la maestría.

Con profunda gratitud y respeto para mi director de tesis, el Dr. Luis Felipe Jiménez García, por su gran apoyo, enseñanza y comprensión.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por haberme orientado por segunda ocasión en la culminación de este trabajo.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por sus atinados comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis.

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

Al Dr. Horacio Merchant Larios del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su invaluable asesoría y participación en este proyecto.

A la Dra. María Teresa de Lourdes Agredano Moreno por sus enseñanzas teóricas y técnicas en el campo de la Microscopía Electrónica, así como por su paciencia, estímulo y amistad.

# ÍNDICE

| CONTENIDO  | Página |
|--|--------|
| I. RESUMEN.....  | 1      |
| II. ABSTRACT.....  | 3      |
| III. INTRODUCCIÓN.....                                     | 5      |
| III.1 El Núcleo Celular Interfásico.....                   | 8      |
| III.1.1 La Cromatina.....                                  | 11     |
| III.1.2 El Nucléolo.....                                   | 12     |
| III.1.3 Partículas Ribonucleoproteicas no Nucleolares..... | 13     |
| III.1.3.1 <i>Fibras Pericromatinianas (PCFs)</i> .....     | 14     |
| III.1.3.2 <i>Gránulos Pericromatinianos (PCGs)</i> .....   | 14     |
| III.1.3.3 <i>Gránulos Intercromatinianos (ICGs)</i> .....  | 15     |
| III.1.3.4 <i>Cuerpos de Cajal (CBs)</i> .....              | 16     |
| III.1.3.5 <i>Polipartículas</i> .....                      | 17     |
| III.2 Procesamiento del RNA Pre-mensajero (pre-mRNA).....  | 17     |
| IV. ANTECEDENTES.....                                      | 19     |
| IV.1 Los Gránulos de <i>Lacandonia</i> .....               | 19     |
| IV.2 <i>Adiantum capillus-veneris</i> .....                | 26     |
| IV.2.1 Diagnósis.....                                      | 26     |
| IV.2.2 Ubicación Taxonómica.....                           | 27     |
| IV.3 <i>Equisetum hyemale L.</i> .....                     | 27     |
| IV.3.1 Diagnósis.....                                      | 28     |
| IV.3.2 Ubicación Taxonómica.....                           | 29     |
| IV.4 Ubicación Filogenética de Helechos y Equisetos.....   | 29     |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>                                     | <b>31</b> |
| <b>VI. JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>VII. OBJETIVOS.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>VII.1 Objetivo General.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>VII.2 Objetivos Particulares.....</b>                                      | <b>32</b> |
| <b>VIII. HIPÓTESIS.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>IX. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>IX.1 Recolección del Material Biológico.....</b>                           | <b>33</b> |
| <b>IX.2 Procesamiento de las Muestras Vegetales.....</b>                      | <b>34</b> |
| <b>IX.3 Realización de los Cortes Semifinos y Ultrafinos.....</b>             | <b>35</b> |
| <b>IX.4 Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....</b> | <b>37</b> |
| <b>X. RESULTADOS.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>XI. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>XII. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>XIII. REFERENCIAS.....</b>   | <b>60</b> |

## I. RESUMEN

El análisis ultraestructural del núcleo de *Lacandonia schismatica* (Triuridales), reveló la presencia de los gránulos de *Lacandonia*, los cuales son partículas de aproximadamente 32 nanómetros (nm) de diámetro que usualmente se localizan formando cúmulos. Los estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* sugieren que son partículas ribonucleoproteicas que funcionan como almacenes de ácido ribonucleico mensajero (mRNA), ya que contienen ácido ribonucleico poliadenilado (RNA poli(A)<sup>+</sup>) y proteínas de la familia SR. Estas últimas son elementos de la maquinaria de *splicing*, que intervienen también en el transporte del mRNA hacia el citoplasma. Por otra parte, los estudios de la biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* en dos especies de plantas con semilla como *Ginkgo biloba* y *Taxodium mucronatum*, han permitido detectar diferentes etapas en la biogénesis ultraestructural de estas partículas.

Los gránulos de *Lacandonia* se distribuyen ampliamente a lo largo del reino Plantae, desde los grupos de plantas con semilla hasta precursores de las plantas como las algas del género *Choleochaete* (Tesis de Jiménez-Ramírez, J. aún no publicada). En angiospermas, los gránulos de *Lacandonia* se han encontrado en otras especies del orden Triuridales como *T. alata* y *Soridium spruceanum*, así como en otros grupos de plantas como *Illicium floridanum* (*Illiciaceae*), *Pelargonium hortorum* (*Geraniaceae*), *Tulipa sp.* (*Liliaceae*) y *Alloe vera* (*Asphodelaceae*). En gimnospermas estas partículas se encuentran en *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*) y *Taxodium mucronatum* (*Taxodiaceae*).

En el presente trabajo se exploró la biogénesis a través de un análisis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* en grupos florísticos tempranamente divergentes que prescindan de semilla, como las pteridofitas (*Adiantum-capillus-veneris*) y los equisetos (*Equisetum hyemale L*), cuyos orígenes se remontan a 300 y 370 millones de años respectivamente. Lo anterior, con el propósito de detectar las etapas de formación del fenotipo de los gránulos de *Lacandonia* y determinar, si el proceso de biogénesis es similar en plantas con y sin semilla. El análisis de los gránulos de *Lacandonia* se realizó mediante la generación de imágenes estéreo pares ultraestructurales, para demostrar la relación fibras-gránulos de *Lacandonia* y determinar si esta etapa antecede a la formación de gránulos de *Lacandonia* maduros y bien definidos, a partir del enrollamiento de las fibras. En este trabajo, se detectaron al menos tres etapas de formación de los gránulos de *Lacandonia* siempre vinculadas con el entrelazamiento de las fibras circundantes, tanto en las regiones pericromatinianas como intercromatinianas.

## II. ABSTRACT

The ultrastructural analysis of *Lacandonia schismatica* nucleus revealed the presence of the *Lacandonia* granules, intranuclear particles 32 nm in diameter that usually are present as clumps. The citochemical, immunocitochemical and *in situ* hidridization studies suggest that *Lacandonia* granules are ribonucleoprotein particles involved in mRNA storage, because contain polyadenilated ribonucleic acid (RNA poli(A)<sup>+</sup>) and proteins of the SR family. These factors are elements of *the splicing* machinery that take part in the mRNA transport towards the cytoplasm too. On the other hand, the ultrastructural biogenesis studies of *Lacandonia* granules in two species of seed plants as *Ginkgo biloba* and *Taxodium mucronatum* have allowed to detect different stages in the ultrastructural biogenesis of these particles.

The *Lacandonia* granules are distributed widely in the Plantae kingdom, and also in the algae *Choleochaete* (Jiménez-Ramírez, J., unpublished thesis). In angiosperms *Lacandonia* granules are present in other species of Triuridales as *Triuris alata* and *Soridium spruceanum* and also in plants as in *Illicium floridanum* (*Illiciaceae*), *Pelargonium hortorum* (*Geraniaceae*), *Tulipa sp.* (*Liliaceae*) and *Alloe vera* (*Asphodelaceae*). In gimnosperms these particles are located in *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*) and *Taxodium mucronatum* (*Taxodiaceae*).

In this work we studied the ultrastructural aspects of the biogenesis of *Lacandonia* granules in two species unseeded plants pteridophyta (*Adiantum-*

*capillus-veneris*) and equiseta (*Equisetum hyemale* L) to determine if the biogenesis process is similar in plants with and without seed. The analysis of *Lacandonia* granules was performed by generating ultrastructural stereopairs images in order to demonstrate the relation between fibers and granules. Results suggest that granules derive from fibrous elements and at least three stages of formation take place.

### III. INTRODUCCIÓN

La planta *Lacandonia schismatica* es una angiosperma extraña y endémica encontrada en la selva Lacandona en Chiapas, México, la cual mide menos de dos centímetros de altura y crece en la hojarasca (Márquez-Guzmán, J. *et al.* 1989). Es considerada un verdadero cisma, pues dentro de las más de 250 000 plantas con flores conocidas en el mundo (Judd, W. S. *et al.* 2002), *L. schismatica* es la única planta cuya flor hermafrodita posee los órganos sexuales espacialmente invertidos (Martínez, E. y Ramos, C. 1989; Márquez-Guzmán, J. 1989): tres estambres centrales y de 40 a 80 carpelos alrededor, configurando una estructura radialmente simétrica con 6 tépalos. Pertenece al grupo de monocotiledóneas de la familia Lacandoniaceae, compuesta de hierbas micoheterótrofas inconspicuas y aclorófilas (Ambrose, B. A. *et al.* 2006).

Los avances tecnológicos en la microscopía electrónica y de fuerza atómica, han permitido evidenciar la ultraestructura de los núcleos celulares de *L. schismatica* (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992; 1998; Jiménez-García, L. F. y Fragoso-Soriano, R. 2000). El núcleo celular exhibe la heterocromatina de tipo reticulada asociada a partículas denominadas “gránulos de *Lacandonia*”, los cuales son partículas ribonucleoproteicas extranucleolares muy abundantes. Presentan un tamaño intermedio (alrededor de 32 nm de diámetro) con relación a los gránulos pericromatinianos (PCGs) y los cuerpos de Cajal (GBs), se observan en el microscopio electrónico formando cúmulos en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992;

Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002). Los gránulos de *Lacandonia* y las fibras circundantes asociadas se contrastan con la tinción de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) de Bernhard (Bernhard, W. 1969; Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992).

El número de gránulos de *Lacandonia* varía durante el desarrollo de la flor, mostrando similitudes con los PCGs y los GBs presentes en células de mamíferos e insectos respectivamente (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F., 2000). Los PCGs y los GBs son elementos nucleares que parecen estar involucrados en el metabolismo del RNA (ácido ribonucleico), sobre todo en el transporte y/o almacenamiento del mRNA (Vázquez-Nin, G. y Bernhard, W. 1971; Vázquez-Nin, G. *et al.* 1978).

Tomando como base estudios morfológicos, de desarrollo, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ*, se encontró que los gránulos de *Lacandonia* presentan similitudes importantes con relación a otros elementos nucleares como los GPs y los GBs. Tal como ocurre en estas partículas nucleares, los estudios inmunocitoquímicos de los gránulos de *Lacandonia* permitieron la identificación de factores de *splicing* de la familia SR y RNA poli(A)<sup>+</sup>, cuya presencia sugiere que los gránulos de *Lacandonia* están involucrados en eventos postranscripcionales como el almacenamiento y/o transporte de mRNAs (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000).

Los gránulos de *Lacandonia* se han encontrado en taxa diferentes de plantas. En especies del orden Triuridales como *T. alata* (Jiménez-García, L. F. 1992),

*T. brevistylis* (Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002) y *S. spruceanum* (Zamora-Cura, A. L. Tesis. 2006); en especies del orden Asparagales como *A. vera* y del orden Liliales como *Tulipa sp.*; en especies del orden Austrobaileyales como *Illicium floridanum* y Geraniales como *Pelargonium hortorum* (Guzmán-López, A. G. Tesis. 2003); en gimnospermas del orden Ginkgoales como *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002) y Pinneales como *Taxodium mucronatum* (Alonso-Murillo, D. Tesis. 2008); asimismo se encuentran en especies muy antiguas sin semilla como *Adiantum capillus-veneris* del orden Pteridales y ejemplares del orden Equisetales (Jiménez-Ramírez, J. Tesis aún no publicada). Estos datos indican que los gránulos de *Lacandonia* pueden encontrarse en momentos de la escala evolutiva y grupos florísticos diversos, en asociación con una cromatina reticulada (Jiménez-Ramírez, J. Tesis aún no publicada). Por lo anterior, es importante continuar los estudios que permitan una comprensión integral de la presencia, composición molecular y biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia*, como un carácter sinapomórfico a nivel nuclear.

Con la finalidad de conocer la biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia*, se han realizado estudios recientes de estas partículas en núcleos de las gimnospermas como *G. biloba* y *T. mucronatum* mediante el análisis de imágenes estéreopares, generadas mediante el uso de un goniómetro integrado al microscopio electrónico de transmisión. Las imágenes estéreopares fueron visualizadas con lentes estereoscópicas que permiten reconstruir tridimensionalmente el espacio ocupado por los gránulos de *Lacandonia* y las fibras asociadas en el espacio pericromatiniano e

intercromatiniano (Gaona- López, C. Tesis. 2008; Alonso-Murillo, D. Tesis. 2008).

Dichos estudios demostraron que los gránulos de *Lacandonia* son elementos que forman parte de una compleja red fibrogranular. En el caso de *G. biloba* se detectaron tres estadios de la biogénesis ultraestructural, siendo el primer estadio de gránulos en formación con más fibras asociadas y de tamaño menor a los 32 nm, el de mayor duración (Gaona- López, C. Tesis. 2008).

### III.1 Núcleo Celular Interfásico

El núcleo celular es el organelo característico de las células eucariotas. Fue descrito por primera vez en 1804 por Franz Bauer y posteriormente, caracterizado con más detalle por el botánico escocés Robert Brown en 1831 durante una conferencia dictada para la Sociedad Linneana de Londres (en Harris, H. 1999). Contiene la mayor parte del material genético celular. La función del núcleo es almacenar y proteger la integridad del genoma contra el estrés ambiental, de modo que, pueda controlar la actividad celular a través de la expresión génica (en Alberts, B. *et al.* 2002).

Los principales elementos estructurales del núcleo celular son: la **envoltura nuclear** integrada por una doble membrana que hace la función de separación del citoplasma. La membrana externa de la envoltura nuclear es continua con el retículo endoplásmico rugoso que contiene ribosomas. La envoltura nuclear se encuentra interrumpida por elementos proteicos denominados **complejos**

**de poro** los cuales tienen una subestructura definida, semejante a una “canastilla” que se extiende hasta el nucleoplasma y permite la transferencia de materiales entre el núcleo y el citoplasma. El núcleo presenta una **lámina nuclear**, esto es, una red de filamentos intermedios que se encuentran en el interior de la envoltura y confieren soporte mecánico, tal y como lo hace el citoesqueleto. La **lámina nuclear periférica** está compuesta por lamininas A/C y B y algunos autores consideran que participa en la regulación estructural de la envoltura nuclear, así como en el anclaje de la cromatina en interfase a la periferia nuclear. Los parches internos formados por lamininas también se encuentran presentes en el nucleoplasma (Spector, D. L. 1993; Stoffler *et al.*, 1999; Moir, *et al.* 2000, Alberts, B. *et al.* 2002).

El núcleo celular está organizado en dominios especializados, los cuales son estructuras dinámicas con frecuentes interacciones, que consisten en intercambios rápidos de proteínas (en Spector, D. L. 2001).

Un ejemplo de estos dominios es el **nucléolo**, un elemento responsable de la síntesis y procesamiento del RNA pre-ribosomal y del ensamblado de las unidades del ribosoma (28S, 18S, 5.8S) (en Jiménez-García, L. F. y Merchant-Larios, H. 2003). Es el dominio responsable de la biogénesis de la mayoría de las partículas ribonucleoproteicas (RNPs) y de la regulación del ciclo celular, lo que lo hace central en el proceso de expresión génica (Thiry, M. y Lafontaine, D. L. 2005). Asimismo, se han detectado RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y RNAs pequeño nucleolares (snoRNA) (Shaw, J. P. y Brown WS. J. 2004).

En el nucleoplasma se encuentran **partículas ribonucleoproteicas no nucleolares**, como las PCFs, los PCGs, los gránulos intercromatinianos, cuerpos de Cajal y polipartículas. La relación entre todos estos compartimentos permite la regulación de la expresión génica y el procesamiento del RNA pre-mensajero (pre-mRNA) (Recillas-Targa, F. y Escamilla Del Arenal, M. 2004).

En la planta *L. schismatica* y otras monocotiledóneas se encuentran los gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García et al., 1992). En el núcleo de *L. schismatica*, se localizan elementos no ribonucleoproteicos como el complejo tipo sinaptonémico, el cual es morfológicamente muy parecido con los complejos sinaptonémicos de la profase meiótica que describió por primera vez Moses, M. J. (1956).

La variedad de elementos que conforman la organización nuclear, se ha dilucidado gracias a los avances en la microscopía electrónica de transmisión y de fluorescencia. De modo que, se ha podido determinar que el núcleo celular es una entidad dinámica y participativa en la regulación de la expresión génica. Cada uno de los compartimentos que se encuentran en el núcleo, poseen funciones bien definidas que van desde almacenar a los factores de transcripción, los factores ligados al procesamiento de los pre-mRNAs, hasta los genes ribosomales albergados en el nucléolo, entre otros (Recillas-Targa, F. y Escamilla Del Arenal, M. 2004).

### III.1.1 La Cromatina

En células eucariontes, la cromatina es la región del núcleo donde se localiza el ácido desoxirribonucleico (DNA) con sus proteínas asociadas. La mayoría de las proteínas asociadas son proteínas básicas pequeñas denominadas *histonas*. Existen otras proteínas *no histónicas* que se asocian de igual forma con el DNA, aunque no son tan abundantes. Las proteínas no histónicas son las encargadas de regular la transcripción, la duplicación, la reparación y la recombinación del DNA celular (en Watson, J. D. *et al.* 2006).

Existen cinco tipos de proteínas histónicas que se diferencian con base en la abundancia de dos aminoácidos en específico, tales como la lisina y la arginina. Las histonas con alto contenido de lisina son H1; las que presentan baja cantidad de lisina son H2A; las moderadamente ricas en lisina son H2B. Las histonas ricas en arginina son H3 y H4. Evolutivamente, las histonas son las proteínas más conservadas (en Alberts, B. *et al.* 2002).

El complejo de cromatina permite contener al genoma en el interior del núcleo celular. La unidad fundamental de ésta es el nucleosoma, conformado por un octámero de histonas (dos de cada una de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4), alrededor del cual interaccionan 147 pares de bases (pb) de DNA. Existen diferentes niveles de compactación del DNA, siendo el cromosoma en metafase el nivel más elevado (Recillas-Targa, F. y Escamilla del Arenal, M. 2004).

En plantas, la heterocromatina del núcleo se distribuye de dos formas, que dan lugar a núcleos de tipo cromocéntrico y varios de tipo reticulado (Barlow, P. W. 1977). En los núcleos cromocéntricos, la mayor parte de la cromatina se encuentra adosada a la envoltura nuclear en forma de pequeños fragmentos. El resto de éstos, constituyen cromocentros que se dispersan por el espacio nucleoplásmico (Echeverría, O. *et al.*, 1999). Los núcleos cromocéntricos se encuentran principalmente en las plantas dicotiledóneas. En cambio, los núcleos reticulados presentan cromatina con una estructura de red distribuida por toda el área nuclear. Se localizan principalmente en plantas monocotiledóneas, gimnospermas, briofitas y clorofilas o algas verdes (en Jiménez, G., L. F., Merchant, H., 2003).

### **III.1.2 El Nucléolo**

El nucléolo es la estructura más conspicua que se ha observado en el núcleo de la célula eucariota. Fue detectado por los primeros citólogos del siglo XIX (1898) y registrado en alrededor de 700 referencias (en Alberts, B. *et al.* 2008).

A diferencia de los principales organelos de la célula, el nucléolo no está rodeado por una membrana, sino que es un gran agregado macromolecular que incluye a los genes rRNA, los precursores de rRNAs, RNAs maduros, enzimas de procesamiento de rRNA, snoRNPs, proteínas ribosomales y ribosomas parcialmente ensamblados. Presumiblemente, la asociación cercana de todos estos componentes permite que el ensamblaje de los ribosomas ocurra de manera rápida y fluida (en Alberts, B. *et al.* 2008).

El nucléolo tiene varios tipos de moléculas de RNA, los cuales juegan un papel central en la química y estructura del mismo. Esto sugiere que el nucléolo evolucionó a partir de alguna estructura antigua presente en células dominadas por la catálisis de RNA. Actualmente se sabe que los genes ribosomales juegan un papel importante en la formación del nucléolo (en Alberts, B. *et al.* 2008).

Ultraestructuralmente, el nucléolo muestra tres regiones diferentes: los centros fibrilares (FCs), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC). En el caso de las plantas, visto al microscopio electrónico con técnicas convencionales, el DFC no se encuentra tan fuertemente contrastado como en las células animales, además que en las plantas el DFC ocupa alrededor de un 70% de volumen del nucléolo. Los FCs contienen rDNA, RNA pol I y factores asociados a la transcripción del rDNA. En algunas plantas el nucléolo muestra una región prominente ubicada en el centro, llamada cavidad nucleolar y en otras, se presenta como la cromatina nucleolar condensada asociada a la periferia del nucléolo. Por lo general, el nucléolo de las plantas es muy regular en su organización, siendo casi esférico (Spector, D. L. 1993; Dundr, M. y Misteli T. 2001; Jiménez-García y Merchant-Larios, H. 2003; Shaw, J. P. y Brown, WS. J. 2004).

### **III.1.3 Partículas Ribonucleoproteicas no Nucleolares**

Cuando se logran avances en los procedimientos de la citoquímica ultraestructural, comienza el diseño de diferentes experimentos para conocer la

naturaleza y función de las partículas ribonucleoproteicas en el núcleo (en Jiménez-García, L. F. y Merchant-Larios, H. 2003). Las estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) fueron caracterizadas por Monneron, A. y Bernhard, W. (1969) en el núcleo de células de mamíferos, utilizando un método de tinción diferencial para RNPs (Bernhard, W. 1969) e hidrólisis enzimática.

### **III.1.3.1 Fibras Pericromatinianas (PCFs)**

Dentro de las primeras estructuras RNPs descritas están las PCFs, caracterizadas por Monneron, A. y Bernhard, W. en 1969. Estos autores las definieron como “la expresión morfológica extranucleolar de la transcripción”. Contienen pre-mRNA (Bachelierie, J. P. *et al.* 1975; Fakan, S. *et al.* 1976) que posteriormente se ve sometido al proceso de *splicing* (Fakan, S. 1994). Estructuralmente, las PCFs miden entre 3 y 5 nm de diámetro y se localizan preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta, aunque tienen una distribución homogénea en el nucleoplasma.

### **III.1.3.2 Gránulos Pericromatinianos (PCGs)**

Los PCGs son estructuras ribonucleoproteicas descritas por primera vez por Watson, M. L. en 1962. Son estructuras esféricas que miden entre 30 y 50 nm de diámetro, son EDTA positivas y típicamente, están rodeadas de un halo claro de 25 nm de grosor que permite su fácil identificación por el microscopio electrónico. Por lo regular, se ubican en el borde de los cúmulos de cromatina

compacta, sin embargo, también se han observado en la región intercromatiniana.

Hay evidencias que sugieren que los PCGs almacenan y transportan mRNA hacia el citoplasma, para ser traducidos a proteínas. Comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas hechas por Vázquez-Nin, G. y colaboradores en 1978 han demostrado que los PCGs son estructuras prácticamente idénticas a los GBs, por eso se sugirió que ambos gránulos cumplían la misma función (en Jiménez García, L. F. y Merchant-Larios, H. 2003; Monneron, A. y Bernhard, W. 1969).

### **III.1.3.3 Gránulos Intercromatinianos (ICGs)**

Fueron descritos por primera vez en 1959 por Hewson Swift como agregados polimorfos que pueden encontrarse conectados a fibrillas, ubicándose en los espacios intercromatinianos del núcleo (Puvion, E. y Moyne, G. 1981).

Los ICGs son elementos nucleares que miden entre 20-25 nm de diámetro (Monneron, A. y Bernhard, W. 1969). Los ICGs realizan funciones muy importantes con relación al ensamblado, modificación y almacenamiento de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA, tales como las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs), las proteínas SR (como el factor SC35) involucradas en el proceso de *splicing* y la subunidad grande de la RNA polimerasa II en su forma hiperfosforilada (Jiménez-García, L. F. *et al.* 2007).

Los análisis proteómicos de los ICGs han permitido la identificación de 146 proteínas de diferentes tipos, entre ellas, las pertenecientes a la familia SR. Estas proteínas participan en el reconocimiento del RNA y del dominio SR (Saitoh, N. *et al.* 2004).

#### **III.1.3.4 Cuerpos de Cajal (CBs)**

Los cuerpos de Cajal o *coiled bodies* (CBs) fueron identificados por primera vez por el investigador español Ramón y Cajal en 1903, quien los describió como cuerpos accesorios del nucléolo. Posteriormente, se describieron ultraestructuralmente por Monneron y Bernhard en 1969 como agregados esféricos de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, contrastados por el procedimiento de acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo. Los CBs están formados por fibras de 40-60 nm de grosor que se ubican en la zona intercromatinina. Contienen moléculas que participan en la biogénesis del RNA nuclear. Se sugiere que intervienen en la modificación y ensamblaje de snRNPs. De igual manera, contienen snoRNPs que están involucradas en el procesamiento del pre-rRNA. También se han localizado proteínas como fibrilarina (proteína específica del nucléolo), p80 coilina (específica de esta estructura) y factores de *splicing* (U1, U2, U4, U6 y U5), así como el U3snRNA nucleolar (precursores del U14 en plantas). Los CBs se disgregan durante la mitosis y se vuelven a formar durante al fase G1 del ciclo celular (Lamond, A. I. y Spector, D. L. 2003; Gall, J. G. 2000).

### **III.1.3.5 Polipartículas**

Son estructuras ribonucleoproteicas que al ser observadas mediante el microscopio electrónico, presentan la forma de cuentas ensartadas en un hilo. Tienen un tamaño de 25 nm de diámetro y son EDTA positivas. Contienen RNA mensajero como pre-mensajero de alto peso molecular (en Jiménez-García y Merchant-Larios, H. 2003).

### **III.2 Procesamiento del RNA Pre-mensajero (pre-mRNA)**

En los organismos eucariontes, la expresión génica es un proceso que involucra la transcripción y los fenómenos de procesamiento del pre-mRNA, entre ellos se encuentran la formación de un capuchón en el extremo 5' del RNA, el *splicing* del transcrito primario de RNA y la poliadenilación del extremo 3' del RNA. El más complejo es el evento de *splicing*, mediante el cual se eliminan los intrones no codificadores para dar lugar a un mRNA maduro (en Watson, J. D *et al.* 2006). Los eventos que conforman el procesamiento del pre-mRNA no se dan de manera aislada, sino de forma acoplada entre sí (en Agredano-Moreno, L. T. Tesis. 2001).

La formación del capuchón en el extremo 5', consiste en adicionar una base guanina metilada en el extremo 5' del RNA. Esta guanina metilada se une al transcrito de RNA por medio de un enlace 5'-5' inusual que comprende tres fosfatos. El capuchón se forma en tres pasos enzimáticos. En el primero, se

elimina un grupo fosfato del extremo 5' del transcrito. Segundo, se añade el GTP y por último, se metila ese nucleótido (en Watson, J. D. *et al.* 2006).

El RNA adquiere su capuchón cuando tiene alrededor de unos 20 a 40 nucleótidos de longitud, esto es, cuando el ciclo de la transcripción progresó solo hasta la transición entre la fase de iniciación y la de alargamiento (en Watson, J. D. *et al.* 2006).

El *splicing* se lleva a cabo en dos pasos catalíticos. En primer lugar, un residuo de adenosina que se ubica en la secuencia de RNA cerca del extremo 3' del intrón, realiza un ataque nucleofílico sobre el sitio 5' del empalme, generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Simultáneamente, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su segunda reacción de transesterificación, en la que el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de empalme 3'. El resultado de estas reacciones es una estructura en forma de "lazo", al mismo tiempo que se unen los exones para producir el mRNA maduro. El intrón con estructura de "lazo" se rompe en su enlace 5'-2', se extiende linealmente y queda expuesto para ser degradado, o bien, procesado para que nuevamente de lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA).

Una vez que se alcanzó el extremo final de un gen, la RNA polimerasa localiza secuencias específicas que, después de que se transcribieron en RNA, desencadenan la transferencia de las enzimas de poliadenilación hacia ese RNA, dando como resultado la fase de poliadenilación que implica: la escisión

del mensaje, la adición de muchos residuos de adenina a su extremo 3' y enseguida, la terminación de la transcripción por la polimerasa. El primer paso es un rompimiento endonucleolítico en el sitio de poli-A, el cual es secundado por una adición lenta de aproximadamente 10 residuos de adenosina en dirección "río arriba", luego la cola corta de oligo (A) se elonga rápidamente. Previo a la etapa de escisión del RNA, éste es reconocido por el factor de especificidad de la poliadenilación y rompimiento, el CPSF y por el factor CstF. Las colas de poli-A confieren estabilidad al mensajero, eficiencia en la traducción y en el transporte de los mRNAs procesados del núcleo hacia el citoplasma. En realidad, es un proceso acoplado con el empalme o *splicing* (Agredano-Moreno, L. T. Tesis doctoral. 2001; Watson, J. D. *et al.* 2006; Jiménez-García, L. F. *et al.* 2007).

## **IV. ANTECEDENTES**

### **IV.1 Los Gránulos de *Lacandonia***

Los rasgos tan peculiares de la planta *L. schismatica* suscitaría el interés por estudiar los aspectos celulares y ultraestructurales de la misma, de modo que, se decidió explorar el núcleo interfásico de esta planta mediante la microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión con técnicas de citoquímica ultraestructural. En los núcleos celulares se encontraron estructuras tipo complejo sinaptonémico, cuerpos asociados a nucléolo, centrómeros y cuerpos espiralados (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992). La presencia del complejo tipo sinaptonémico en células somáticas provenientes de órganos diferentes causó confusión (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992), puesto que previamente se

identificó en células post-meióticas como las microsporas de *Allium cepa*. Este hallazgo se interpretó como un posible relicto del complejo sinaptonémico que refleja un fenómeno de recombinación (Esponda, P. 1977). En el caso de los cuerpos asociados a nucléolo, las micrografías electrónicas revelan la presencia de fibrillas que sugieren que estos cuerpos se originaron en el nucléolo. Los centrómeros y cuerpos espiralados son elementos muy similares a los descritos en otros sistemas de plantas como *Allium fistulosum*, *Allium porrum* y *Allium cepa*. Los cuerpos en forma de anillo (0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro) y asociados al nucléolo, fueron otras estructuras encontradas de forma constante en los núcleos de las especies Triuridales y en otras especies saprofiticas como *Voyria aphylla* (dicotiledónea) y *Gymnosiphon divaricatus* (monocotiledónea), sin embargo, estas últimas especies no presentan el mismo patrón nuclear de las Triuridales (en Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992).

De igual forma, la microscopía electrónica de transmisión permitió el descubrimiento de nuevas estructuras ribonucleoproteicas que fueron denominadas gránulos de *Lacandonia* por Jiménez-García, L. F. *et al.* en 1992. Las mediciones morfométricas determinaron que los gránulos de *Lacandonia* tienen un tamaño de  $32 \pm 3$  nm de diámetro y que conforman grandes cúmulos en los espacios intercromatinianos y pericromatinianos. El tamaño y la distribución espacial de los gránulos de *Lacandonia* son intermedios entre los PCGs y los ICGs que se encuentran en las células animales y algunas plantas (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992). Los gránulos de *Lacandonia* también se localizan en otras plantas del orden Triuridales como *T. alata* (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992) y *S. spruceanum* (Zamora-Cura, A. L. Tesis. 2006). Al

comparar los tamaños de los gránulos de *Lacandonia* entre *L. schismatica* y *T. alata*, se determinó un tamaño de  $31 \pm 2$  nm de diámetro en ésta última y sin diferencias significativas entre ambas ( $P > 0.05$ ) (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992).

Los estudios citoquímicos del núcleo de *L. schismatica* fueron seguidos por la implementación de pruebas inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ*, que arrojaron nuevos resultados sobre la relación estructural y citofisiológica de los gránulos de *Lacandonia* con respecto a otras estructuras ribonucleoproteicas descritas previamente. Se encontraron importantes similitudes con los PCGs y los GBs.

Las pruebas citoquímicas evidenciaron estas semejanzas. Los gránulos de *Lacandonia* son relativamente insensibles a la RNAasa, aunque la mayoría de ellos desaparecen o disminuyen su tamaño si se suministra un tratamiento previo con pronasa (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 1994). Una reacción similar a la que ocurre tanto en los gránulos pericromatianos (Monneron, A. y Bernhard, W. 1969) como en los GBs (Vázquez-Nin, G. H. y Bernhard, W. 1971). La tinción con oxinitrato de bismuto después de hacer la fijación con glutaraldehído, no reacciona ni con los gránulos de *Lacandonia* ni con los pericromatinianos en células de hígado de mamífero (en Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 1994), aunque una tinción discontinua puede observarse en la periferia de algunos gránulos más pequeños que los gránulos de *Lacandonia*, lo que indica que estos gránulos más pequeños no son equivalentes con los ICGs (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 1994).

Con respecto a la asociación de los gránulos de *Lacandonia* con otros elementos nucleares, se ha observado la presencia de fibrillas finas que forma parte de la cromatina extendida y que se conectan con los gránulos (Agredano-Moreno, L. T. 1994). Esta característica también se detectó en las zonas *puff* de los cromosomas politénicos en las células de los anillos de Balbiani (Vázquez-Nin, G. H. y Bernhard, W. 1971). De igual manera, se han identificado a las proteínas snRNPs en la periferia de los gránulos de Balbiani inmaduros, ubicados en zonas de transcripción activa (Vázquez-Nin, G. H. *et al.* 1976). Los primeros estudios de inmunocitoquímica ultraestructural, revelaron que estas proteínas se localizan principalmente en las PCFs, los gránulos intercromatinianos, los cuerpos espiralados y ocasionalmente en los PCGs (Fakan, S. *et al.* 1984; Puvion, E. *et al.* 1984), reforzando la evidencia de similitud con los gránulos de *Lacandonia*.

Los estudios posteriores del núcleo de *L. schismatica* utilizando microscopía electrónica, inmunolocalización ultraestructural y la hibridización ultraestructural *in situ*, aportaron nueva evidencia sobre la relación ultraestructural y funcional de los gránulos de *Lacandonia* con los PCGs y los GBs (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000).

Los análisis de microscopía electrónica permitieron determinar que el número de gránulos de *Lacandonia* está en función de las etapas de desarrollo floral (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000), un fenómeno similar al observado en los PCGs de núcleos provenientes de epitelio endometrial cuando se aplica un tratamiento con estradiol (Vázquez-Nin, G. H. y

Echeverría, O. 1996). En la evaluación de los gránulos de *Lacandonia*, se analizaron las flores en etapa de pre-antesis (no abiertas, yemas florales con granos de polen en el estado de tres células) y post-antesis (abiertas, etapa en que solo las paredes del polen permanecen en las anteras), encontrándose una mayor cantidad de gránulos de *Lacandonia* en la etapa de pre-antesis (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000), lo cual se explica por el requerimiento de una expresión génica más activa debido a los eventos de polinización, fecundación y formación de los órganos florales que se llevan a cabo durante esta etapa (Márquez-Guzmán, J. *et al.* 1993).

Las pruebas inmunocitoquímicas en los gránulos de *Lacandonia*, demostraron la presencia de factores de *splicing* como las proteínas SR de forma abundante, mediante la utilización del anticuerpo 3C5 (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000). Las proteínas SR constituyen una familia muy conservada de factores de *splicing* que se encuentran en un intervalo amplio de organismos, desde *Drosophila* hasta humanos (en Manley, J. L. y Tacke, R. 1996). Estas proteínas se localizan en las PCFs y están implicadas tanto en el *splicing* esencial como en el alternativo (en Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000). La familia de proteínas SR comparte una organización estructural, que consiste en el reconocimiento de uno o dos motivos amino-terminales del RNA, así como del dominio carboxilo terminal rico en dipéptidos de serina/arginina. También se ha propuesto que las proteínas SR son activas en los procesos de *post-splicing*, como el transporte intranuclear y la translocación del mRNA a través del complejo de poro (Blencowe, B. J. *et al.* 1995; Alzhanova-Ericsson, A. T. *et al.* 1996).

En los GBs, la proteína hrp45 (de la familia SR) es su principal componente como factor de *splicing* de modo que, la presencia de proteínas SR es un rasgo común para los GBs y los gránulos de *Lacandonia*. No obstante, en los gránulos de *Lacandonia*, las proteínas SR pueden jugar un papel diferente al de *splicing*, el cual puede ser de tipo estructural, o bien, estar relacionado con los eventos postranscripcionales de almacenaje y transporte de mRNAs (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000).

Los estudios ultraestructurales de hibridación *in situ* identificaron RNA poli (A)<sup>+</sup> en los gránulos de *Lacandonia*, lo que indica la presencia de mRNAs maduros (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000). Las colas de poli (A)<sup>+</sup> cumplen diversas funciones entre las que destacan el control en la eficiencia de recambio y translocación, sin embargo, algunos de los RNA poli (A)<sup>+</sup> encontrados en *speckles* pueden ser estables (Huang, S. *et al.* 1994). Los PCGs también contienen mRNA maduro, de acuerdo con lo encontrado en estudios donde también utilizaron DNA total como prueba de alta resolución para la hibridación *in situ* (López-Velázquez, *et al.* 1998; Vázquez-Nin, G. H. *et al.* 1999). Esta evidencia también sugiere que los gránulos de *Lacandonia* están involucrados en los eventos post-transcripcionales de almacenaje y transporte de mRNAs (Agredano-Moreno, L. T. y Jiménez-García, L. F. 2000).

Una vez resueltas algunas cuestiones sobre la naturaleza ultraestructural, citoquímica y citofisiológica de los gránulos de *Lacandonia* en núcleos provenientes de *L. schismatica*, surgió el interés por conocer si estas estructuras eran privativas de esta especie y del orden Triuridales. De manera

que, se realizaron nuevos estudios de identificación en diferentes grupos florísticos, que en resumen son los siguientes: en angiospermas del orden Triuridales con núcleos reticulados como *L. schismatica*, *T. alata* (Jiménez-García, L. F. et al. 1992), *T. brevistylis* (Jiménez-Ramírez, J. et al. 2002) y *S. spruceanum* (Zamora-Cura, A. L. Tesis. 2006); en otros tipos de angiospermas como *I. floridanum*, *P. hortorum* (Guzmán-López, A. G. Tesis. 2003), *Aloe vera* y *Tulipa sp*; en plantas gimnospermas como *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, J. et al. 2002) y *Taxodium mucronatum* (Alonso-Murillo, C. D. Trabajo de Investigación. 2008); en plantas sin semilla como *A. capillus-veneris* y especies del género *Equisetum* (Jiménez-Ramírez, J. Tesis aún no publicada).

Recientemente, la caracterización de los gránulos de *Lacandonia* en diferentes grupos de plantas viene acompañada del interés por conocer la biogénesis ultraestructural de estas partículas nucleares. Por medio de la creación de imágenes estéreo pares utilizando un goniómetro integrado en el microscopio electrónico de transmisión, se han obtenido indicios importantes sobre la formación de los gránulos de *Lacandonia*. En los trabajos realizados con núcleos de *Ginkgo biloba* (Gaona-López, C. Tesis. 2008) y *Taxodium mucronatum* (Alonso-Murillo, D. Trabajo de Investigación 2008) se sugiere que los gránulos de *Lacandonia* se originan a partir del enrollamiento paulatino de las fibras nucleares. En los núcleos de las células de las yemas axilares de *Ginkgo biloba* se reconocen tres diferentes estadios de desarrollo de los gránulos, los cuales se establecieron de acuerdo a criterios de la relación fibrogranular y duración dentro de los cúmulos granulares, siendo las etapas

inmaduras el primer estadio de formación con mayor abundancia y duración (Gaona-López, C. Tesis. 2008).

## **IV.2 *Adiantum capillus-veneris***

La especie *A. capillus-veneris* se clasifica dentro del grupo de helechos leptosporangios, de reciente diversificación (Schneider, H. *et al.* 2004) y considerado un grupo hermano de Maratiales y Equisetales (Smith, A. R. *et al.* 2006). Este helecho crece en suelos permanentemente húmedos, con un pH que oscila entre neutro a alcalino. En estado silvestre suelen extenderse sobre rocas de caliza húmeda, ubicadas bajo la sombra de otras plantas, sobre todo angiospermas, donde la luz solar es pobre, pero rica en la gama de rojos (Schneider, H. *et al.* 2004; [www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=C345](http://www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=C345), 21-dic-2009).

### **IV.2.1 Diagnosis**

El nombre de "*Adiantum*", proviene del latín y significa "no mojado", ya que sus frondas repelen el agua. Es un helecho de tipo caducifolio y con crecimiento en racimos, que llega a medir de 23 a 45 centímetros de altura y/o extensión. Crece en forma horizontal y lentamente a través de sus rizomas rastreros. Presenta frondas bipinadas y tripinadas con lóbulos que semejan un triángulo, en cuya parte inferior se desarrollan las esporas, las cuales aparecen durante el verano. En general, su follaje es de textura fina y delicada, haciéndolo atractivo para uso ornamental en las áreas boscosas y jardines. Los tallos son flexibles, oscuros y discurren horizontalmente en forma colgante o arqueada.

Tiene una distribución cosmopolita, preferentemente en las regiones tropicales y templadas, incluyendo América, Europa, Asia y África ([www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=C345](http://www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=C345), 21-dic-2009 ).

#### IV.2.2 Ubicación Taxonómica



Reino: Plantae  
División: Pteridophyta  
Clase: Pteridopsida  
Orden: Pteridales  
Familia: Adiantaceae  
Género: Adiantum  
Especie: *Adiantum capillus-veneris*

#### IV.3 *Equisetum hyemale* L

Se distribuye naturalmente en todo el hemisferio norte: Círculo Ártico, Canadá, Estados Unidos y México (Hauke, R. L. 1995). En Europa, la zona templada de Centroamérica y noreste de Asia hasta China (McVaugh, R. 1992; Mickel, J. T. y Smith, A. R. 2004).

En México, existen registros en Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, D. F., Durango, Estado de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz (Mickel y Smith, 2004; Palacios-Ríos, 1992).

Las especies equisetales son plantas nativas de México donde tienen importantes usos medicinales. Crecen en sitios húmedos, tanto en zanjas de desagüe como en sitios con vegetación natural. Ocasionalmente, las especies equisetales pueden ser una maleza. Se distingue por tener tallos largos y delgados, casi sin ramificaciones.

#### **IV.3.1 Diagnósis**

La planta es una hierba erecta en forma de junco, por lo regular no ramificada, con tallos acanalados, que miden alrededor de 10 mm de diámetro y hasta 2 metros de alto. El tallo es simple, cilíndrico, erecto, verde y articulado con 14 a 50 crestas y surcos longitudinales que generalmente son huecos en el centro. Las hojas son diminutas, con una sola vena y unidas entre sí formando una vaina alrededor del tallo. Las vainas miden hasta 1 cm de largo y más o menos lo mismo de ancho, tornándose de un color pardo-amarillento a gris-cenizo y con un evidente anillo oscuro en la base.

Se reproduce mediante esporas albergadas en esporangios alargados que se abren longitudinalmente. Los esporangios (aproximadamente 6) se encuentran en la superficie interna de los esporangióforos, los cuales se disponen en forma verticilada en los estróbilos ubicados en las puntas de los tallos. Los estróbilos son elípticos y oblongos, miden aproximadamente 15 mm de largo y terminan en una puntita negra. Las esporas son esféricas, de color verde y con 4 eláteres en forma de banda. Sus rizomas son largos y ramificados (Hauke, R.

1995; McVaugh, R. 1992; Mickel, J. T. y Smith, A. R. 2004; Palacios-Ríos, M. 1992).

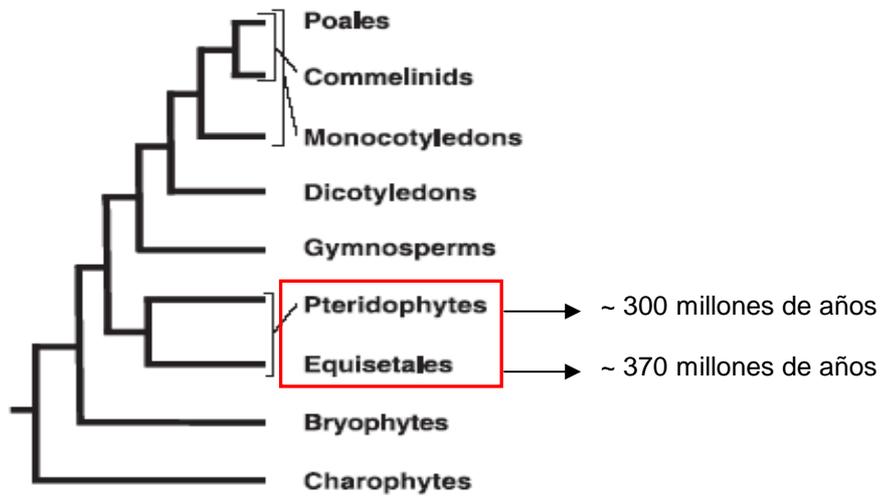
#### IV.3.2 Ubicación Taxonómica



Reino: Plantae  
División: Sphenophyta  
Clase: Equisetopsida  
Orden: Equisetales  
Familia: Equisetaceae  
Género: Equisetum  
Especie: *Equisetum hyemale* L

#### IV.4 Ubicación Filogenética de Helechos y Equisetos

Los estudios genéticos y morfológicos han permitido determinar relaciones filogenéticas más precisas entre los diferentes taxa del reino Plantae. Por un largo período de tiempo, la ubicación filogenética de los helechos y equisetos había sido variable y especulativa, no obstante, ahora se sabe que ambos son grupos hermanos y que comparten un ancestro común, erigiéndose como taxa precursores de los grandes grupos de plantas con semilla como son las gimnospermas y angiospermas (Chase, M. y Fay, M. 2001).



**Esquema 1.** Árbol filogenético simplificado del reino Plantae (modificado de Knox, P. J. 2008).

## V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel ultraestructural, ¿cómo se lleva a cabo el proceso de biogénesis de los gránulos de *Lacandonia* en plantas sin semilla como *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L?

## VI. JUSTIFICACIÓN

Los gránulos de *Lacandonia* se encuentran inmersos en un ambiente fibroso (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992) y estudios (aún no publicados) sobre su biogénesis en núcleos de plantas con semilla como *Ginkgo biloba* y *Taxodium mucronatum* mediante la reconstrucción tridimensional y análisis del ambiente fibrogranular en el nucleoplasma, indican la presencia de una fase fibrosa que antecede la creación de estos gránulos, así como el desarrollo de diferentes etapas de maduración que culmina en la formación de un gránulo de 32 nm. No obstante, hace falta conocer si este patrón ultraestructural de la biogénesis de los gránulos de *Lacandonia* está conservado en la escala evolutiva y por tanto, en grupos florísticos más tempranos (~ 370 millones de años) que prescinden de semilla como *A. capillus veneris* y *E. hyemale* L.

## VII. OBJETIVOS

### VII.1 Objetivo General

Determinar la existencia de una relación ultraestructural entre los gránulos de *Lacandonia* y el ambiente fibroso de los núcleos de *E. hyemale* L y *A. capillus-veneris*, con el fin de establecer una posible ruta en la biogénesis de los gránulos.

### VII.2 Objetivos Particulares

- 1) Analizar la relación entre el ambiente fibroso y los gránulos de *Lacandonia* mediante el estudio de imágenes estéreoapares. Si se demuestra tal relación:
- 2) Proponer una posible ruta de biogénesis ultraestructural para los gránulos de *Lacandonia*.

## VIII. HIPÓTESIS

H<sub>0</sub>: La biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* en plantas sin semilla ( $\mu_1$ ) es igual que en las plantas con semilla ( $\mu_2$ ).

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H<sub>a</sub>: La biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* en plantas sin semilla ( $\mu_1$ ) es diferente con respecto a las plantas con semilla ( $\mu_2$ ).

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

## **IX. MATERIAL Y MÉTODO**

### **IX.1 Recolección del Material Biológico**

Se recolectaron fragmentos pequeños de alrededor de 5 mm de longitud del tallo y la hoja de *E. hyemale* L y *A. capillus-veneris*, respectivamente. Ambas especies localizadas en el Jardín Botánico Exterior de la UNAM. El fragmento minúsculo de cada planta se cortó rápida y finamente sobre una placa de cera con una navaja convencional. Se agregó una gota de solución fijadora, compuesta por glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4%, ambos disueltos en amortiguador de fosfato salino (PBS). Con ayuda de un palito delgado de madera, al que previamente se le hicieron cortes diagonales en un extremo para obtener una punta, se tomó la muestra haciendo giros y se colocó en un frasco de vidrio con tapa conteniendo la solución fijadora (aproximadamente 3 ml). El frasco fue etiquetado con el nombre de la especie y con el tipo de procesamiento que se aplicaría: con tetraóxido de osmio o sin tetraóxido de osmio. En total fueron cuatro para las muestras biológicas y un frasco para la mezcla de fijador, que se transportaron en un recipiente con trozos de hielo. Las muestras biológicas se quedaron en la solución fijadora más de 20 horas.

## **IX.2 Procesamiento de las Muestras Vegetales**

### **1.- Lavados con PBS**

Se realizaron 5 lavados con PBS cada 5 minutos para eliminar la solución fijadora. Para llevar a cabo este paso, se utilizaron pipetas Pasteur de vidrio cuyas puntas fueron aún más adelgazadas haciendo uso del fuego y estiradas con unas pinzas, con el fin de no perder los finos fragmentos de muestra biológica al momento de hacer los cambios de fijador y de PBS.

### **2.- Postfijación con tetraóxido de osmio al 1%**

Este paso solo se realizó para las dos muestras biológicas previamente asignadas para ser tratadas con tetraóxido de osmio al 1%, las cuales se dejaron en esta solución durante toda la noche. El tejido vegetal se tornó en color negro. Se realizó una serie de lavados con PBS y se aplicó el siguiente procedimiento.

### **3.- Deshidratación**

La deshidratación de las muestras biológicas se realizó mediante cambios sucesivos de etanol, con concentración creciente: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 96% durante 5 minutos cada uno. En la última concentración de 100%, se realizaron tres cambios de cinco minutos cada uno.

#### 4.- Preinclusión en resina EPON 1:1

Las muestras se preincluyen en una mezcla de óxido de propileno y resina EPON, ambos en una proporción de 1:1, durante toda la noche. A la mañana siguiente, se destapan los frascos para que se evapore el óxido de propileno lo más posible.

#### 5.- Inclusión en resina EPON pura

En un molde de plástico con 28 cavidades se vierte la resina EPON pura. Después con ayuda de un palito delgado de madera se colocan las etiquetas de las muestras, de tal forma que lleguen hasta el fondo de cada molde. Luego, se colocan los fragmentos biológicos en la base de la cavidad y en cada extremo de lo que será el bloque de resina. Todo se realiza en la campana de extracción. Una vez listo, los bloques con las muestras se dejan polimerizando toda la noche a 60 °C.

### **IX.3 Realización de los Cortes Semifinos y Ultrafinos**

Los bloques de resina obtenidos se retallan con navajas *Gillet* nuevas y limpias, formando una pirámide en cuya cima se talla un trapecio con bordes bien definidos en el sitio donde se incluyó la muestra biológica. Después se realizaron cortes semifinos entre 200-300 nm de espesor con ayuda de un ultramicrotomo LEICA ultracut R. Los cortes semifinos se fijaron por calor en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina para ser observados en un

microscopio óptico Zeiss a 40X, con la finalidad de seleccionar y delimitar con más precisión el área de interés, de la cual se obtendrán los cortes ultrafinos.

Los cortes ultrafinos se realizaron con un espesor entre 40 y 60 nm (color gris o plateado) con ayuda del ultramicrotomo antes mencionado. Luego, los cortes se montaron en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y de malla abierta, las cuales se recubrieron antes con una membrana de formvar.

El proceso de contraste para las muestras tratadas con tetraóxido de osmio es la tinción convencional para microscopía electrónica, la cual consiste en utilizar acetato de uranilo acuoso al 3% y citrato de plomo al 0.3%. La rejilla con los cortes adheridos, se sumerge en una pequeña gota de acetato de uranilo asentada sobre un cuadro de parafilm dentro de una cámara húmeda (una caja de Petri con una mota de algodón humedecida), durante 30 minutos. Después se lava muy bien la rejilla por goteo con agua bidestilada, se seca con papel filtro, se deja secar y se sumerge en una gota de citrato de plomo durante 10 minutos. De igual forma, la gota de citrato de plomo se colocó dentro de una cámara húmeda, pero con una reserva de hidróxido de sodio para evitar que precipite el reactivo. Se lava nuevamente con agua bidestilada por goteo y se seca.

En el caso de las muestras no tratadas con tetraóxido de osmio, se aplica la técnica regresiva de Bernhard de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, W. 1969). El tiempo de tinción con EDTA para *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L fue el mismo. Primero, la rejilla se contrasta con una gota de

acetato de uranilo durante 3 minutos, posteriormente se lava y se seca. Luego se sumerge en una gota de EDTA durante 30 minutos, se lava y se seca. Finalmente, se contrasta con una gota de citrato de plomo durante 3 minutos, se lava y se seca. Al término de cada paso, el lavado se realiza por goteo con agua bidestilada. Los tiempos en esta técnica deben ser muy precisos.

#### **IX.4 Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

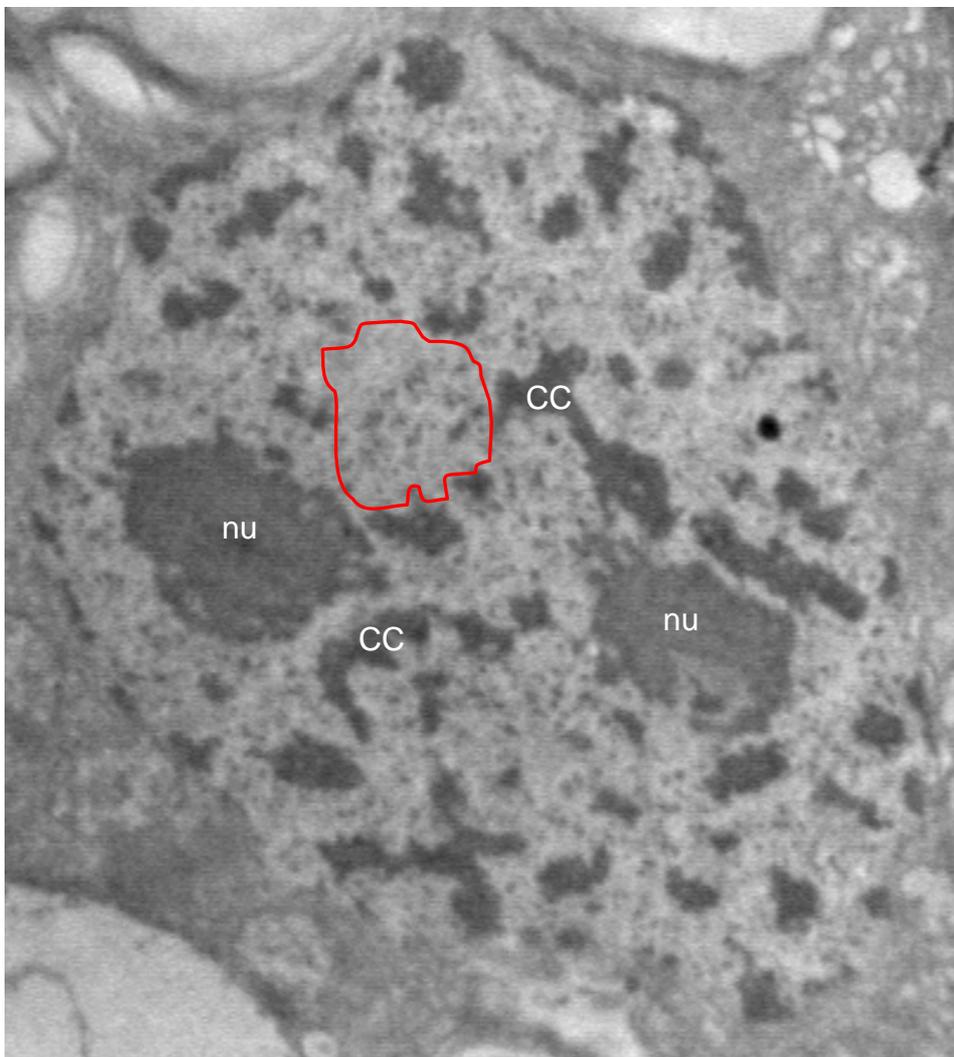
Las rejillas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operando a 80 Kv, utilizando diferentes aumentos para localizar los núcleos celulares. Cuando se seleccionaron las áreas de interés, se tomaron micrografías electrónicas a distintos aumentos empleando la cámara MTI modelo CCD-300-RC, así como el programa *Scion Image for Windows for TEM camera*. Las imágenes fueron guardadas en formato TIFF para luego ser analizadas e interpretadas. El análisis de la biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* se realizó mediante la creación de imágenes estéreopares utilizando el goniómetro del MET. Los ángulos de inclinación fueron de 5, 15 y 20 grados hacia arriba y 5, 15 y 20 grados hacia abajo para generar una imagen anaglífica con ayuda del programa *Anaglyph Maker* ([http://www.stereoeye.jp/software/index\\_e.html](http://www.stereoeye.jp/software/index_e.html)), o bien, lentes estéreoscópicos. De esta forma, se logró el efecto en tercera dimensión (3D) que nos permite visualizar el ambiente fibrogranular, en el cual se encuentran los gránulos de *Lacandonia* a través de la profundidad del corte.

## X. RESULTADOS

Las micrografías electrónicas que se presentan, fueron seleccionadas de un acervo de 75 imágenes con núcleos celulares de *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L, tomadas desde 8000 X hasta 120 000 X. Algunas de estas imágenes consisten de estéreopares generados con la ayuda de un goniómetro integrado al microscopio electrónico de transmisión, el cual posicionó la rejilla que contiene la muestra a inclinaciones de 5, 15 y 20° para visualizar el ambiente fibrogranular a lo largo del grosor del corte.

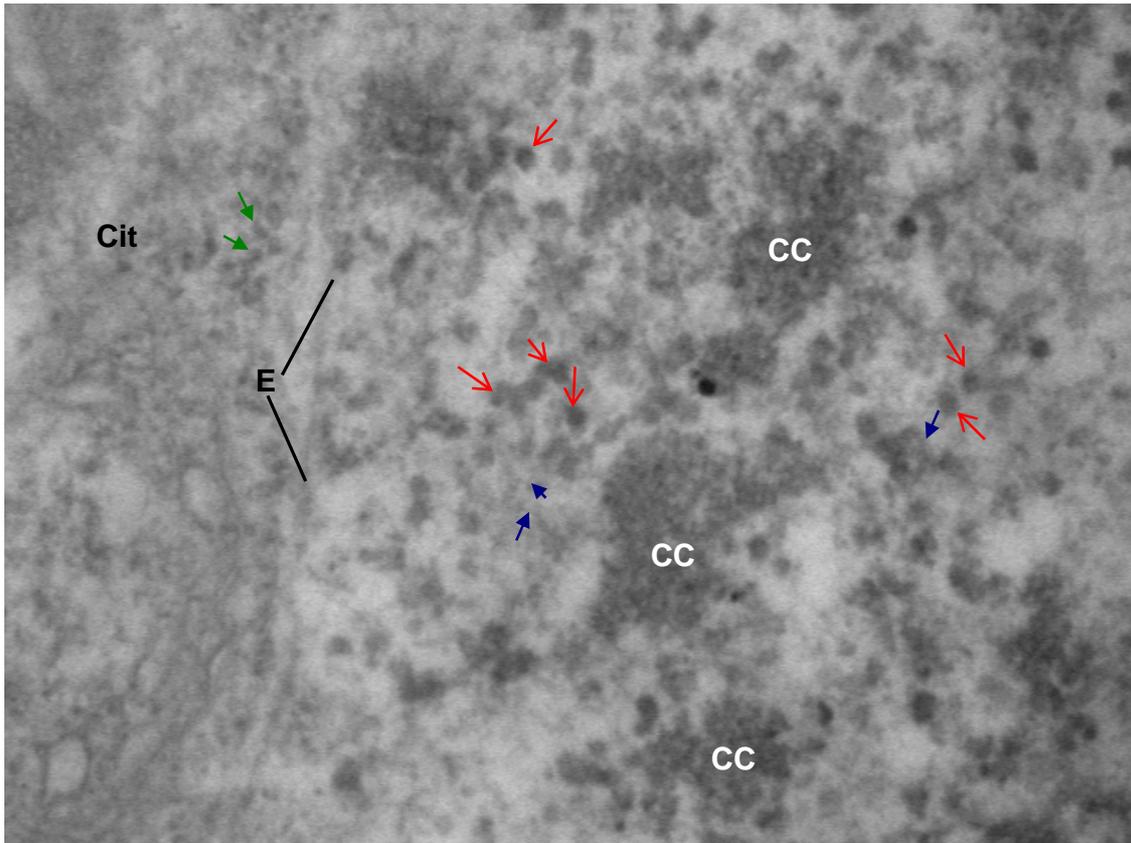
Primero, a bajos aumentos (Fig. 1) se capturaron los núcleos celulares completos de *A. capillus-veneris*, los cuales exhiben núcleos con formas irregulares y asimétricas que pueden ser alargadas, semiovaladas o tendientes a la esfericidad. En los núcleos de esta especie es común observar la envoltura nuclear como dos líneas paralelas, separadas por un estrecho espacio intermembranal e interrumpidas por los complejos de poro. La membrana externa del núcleo se encuentra adyacente al retículo endoplásmico rugoso, un organelo con abundantes ribosomas. Los ribosomas son organelos celulares que se utilizan como punto de referencia para comparar el tamaño de éstos y los gránulos *Lacandonia* (~32 nm de diámetro). Los ribosomas de plantas poseen un tamaño menor a los gránulos de *Lacandonia*. La **figura 1** muestra un núcleo de *A. capillus-veneris* de forma ovalada e irregular con dos nucléolos prominentes que presentan una densidad electrónica mayor que el resto del núcleo. El núcleo exhibe una distribución reticulada de la cromatina, es decir, se observa en forma de red y más electrodensa que el nucleoplasma. La

organización reticulada de la cromatina en *A. capillus-veneris* es una característica que se comparte con otras especies monocotiledóneas como por ejemplo *L. schismatica*, *Allium cepa*, *Allium porrum* y *Triurys brevistylis*, así como gimnospermas como *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, J. et al. 2002). En el nucleoplasma se encuentra la cromatina compacta y se observa un ambiente fibrogranular, que es el sitio donde se localizan los gránulos de *Lacandonia* (área delimitada con un contorno rojo en la Fig. 1), el objeto de estudio en este trabajo.



**Figura 1.** Micrografía electrónica de transmisión (MET) de un núcleo de *Adiantum capillus-veneris* contrastado con la tinción convencional para MET. La región marcada con rojo señala los sitios donde se encuentran los gránulos de *Lacandonia*; nucléolo (nu); cromatina compacta (CC). 8000X.

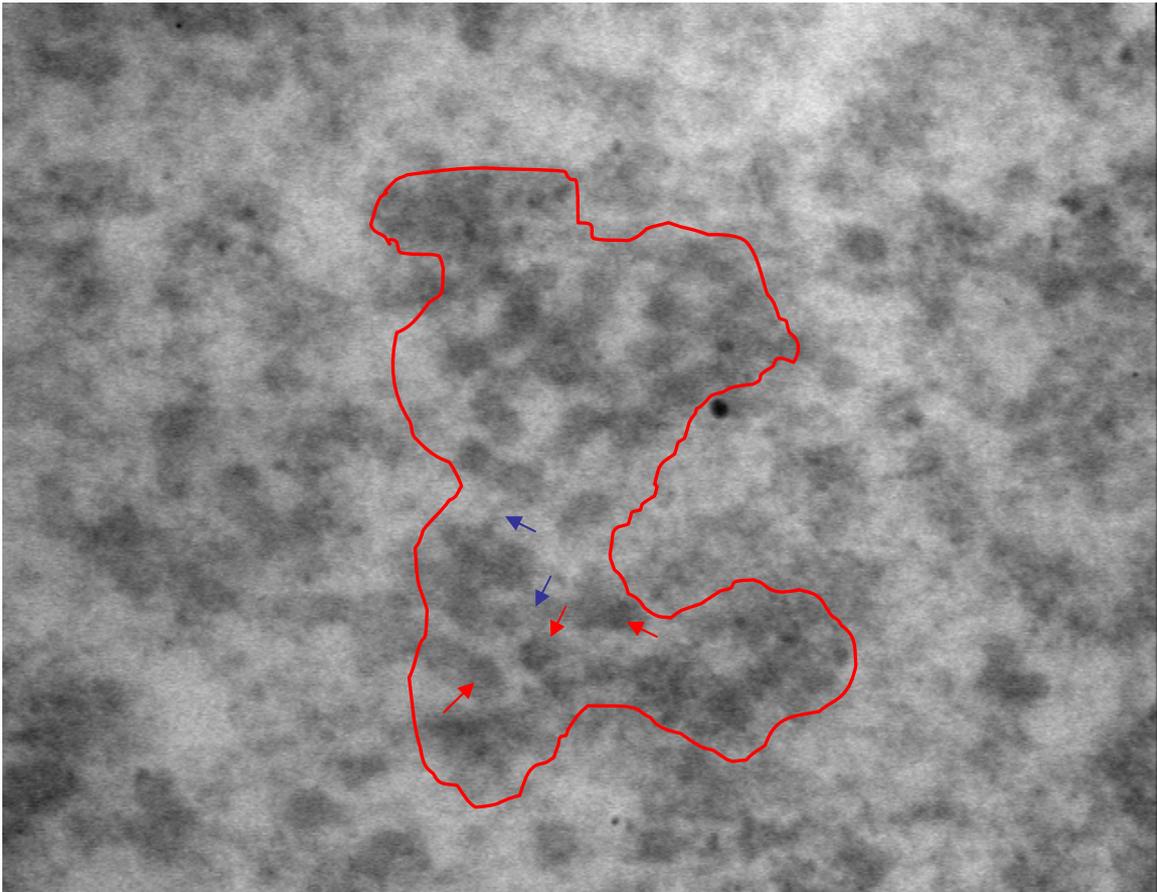
En la **figura 2** se observa a mayores aumentos un acercamiento a las regiones del nucleoplasma entre la cromatina compacta, en las cuales los gránulos de *Lacandonia* se encuentran entremezclados con fibras. En esta imagen es posible distinguir la diferencia de tamaño entre los gránulos de *Lacandonia* y los ribosomas, donde los gránulos de *Lacandonia* se observan más electrodensos que el resto de la masa fibrilar y con dimensiones que triplican el tamaño de los ribosomas (flechas verdes). Al analizar detenidamente la imagen, es posible distinguir que entre las estructuras fibrilares y los gránulos parece existir una conexión entre ellos. Sin embargo, este tipo de imágenes no permite demostrar la conexión entre ambas estructuras. Los gránulos de *Lacandonia* se distribuyen por todo el nucleoplasma, desde las regiones cercanas a la doble membrana hasta la región central del núcleo, en los espacios intercromatinianos y pericromatinianos donde existe abundancia de material fibroso rodeando a los gránulos de *Lacandonia*.



**Figura 2.** Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *Adiantum capillus-veneris* contrastado con la tinción convencional (acetato de uranilo-citrato de plomo), que muestra gránulos (flechas rojas) entremezclados con las fibras (flechas azules). Citoplasma (Cit); envoltura nuclear (E); ribosomas (flechas verdes); cromatina compacta (CC); 80 000 X.

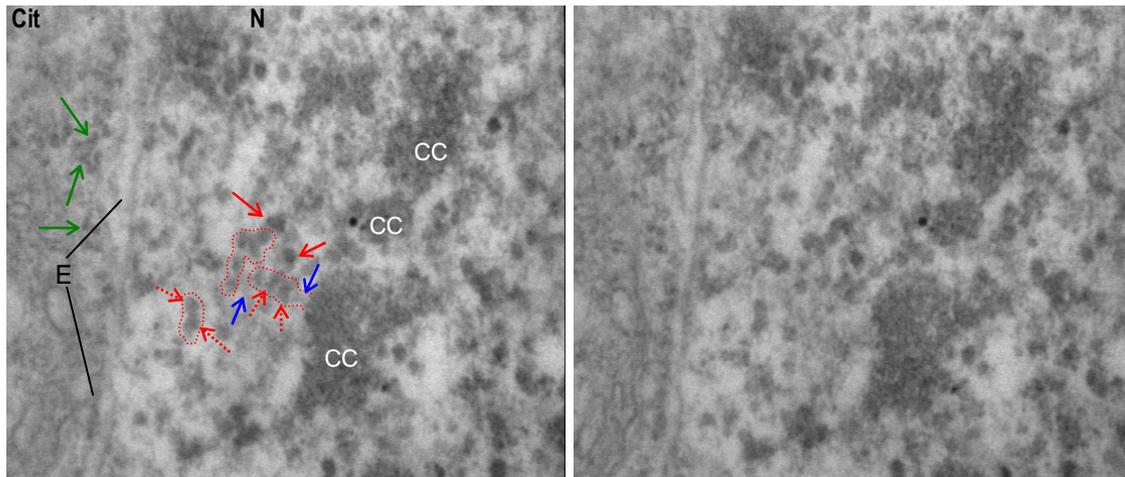
A mayores aumentos como se muestra en la **figura 3**, es posible observar con más detalle las estructuras fibro-granulares, que en su mayoría se organizan en cúmulos grandes tal como se aprecia en esta imagen. Sin embargo, también es posible encontrar algunos gránulos aislados como el señalado cerca del contorno rojo, rodeado de una masa fibrilar menos electrodensa. Esto parece indicar que los gránulos de *Lacandonia* se asocian formando cúmulos abundantes, o bien, se encuentran en partículas aisladas como en el caso de los gránulos de *Lacandonia* presentes en *L. schismatica*, *Ginkgo biloba* y *Taxodium mucronatum*.

Otros aspectos destacables de los núcleos de *A. capillus-veneris* es la relativa heterogeneidad con respecto al tamaño de los gránulos y la presencia de cúmulos granulares. En el primer caso, la heterogeneidad de los diámetros granulares es un rasgo similar a lo que ocurre en otras plantas como *Ginkgo biloba*, en la cual dicha heterogeneidad de tamaños está asociada con los distintos estadios de maduración de la planta (Gaona-López, C. tesis 2008). En el segundo caso, la **figura 3** muestra los gránulos y los haces fibrilares en forma de *cúmulos* localizados en las regiones peri e intercromatinianas, una condición semejante a la reportada por Jiménez-Ramírez, J. *et al.* (2002) para la especie de *Ginkgo biloba*. *E. hyemale* L (Fig. 8) también muestra la formación de cúmulos granulares asociados a fibras, lo cual indica que las primeras expresiones del fenotipo en el orden equisetales y en el orden pteridales es similar, es decir, los gránulos y fibras se asocian para constituir un ambiente fibro-granular. Esto es congruente por la relación filogenética que poseen ambas especies.



**Figura 3.** Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *Adiantum capillus-veneris* contrastado con la tinción convencional (acetato de uranilo-citrato de plomo). El contorno rojo delimita una zona donde predominan los gránulos (flechas rojas) conectados a redes de fibras (flechas azules). 100 000 X.

Las imágenes tomadas a grandes aumentos de *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L sugieren la relación entre fibras y gránulos de *Lacandonia*, sin embargo, no demuestra dicha asociación. Por ello, se decidió primero obtener cortes para contrastar con la tinción convencional de acetato de uranilo y citrato de plomo y posteriormente, crear imágenes estéreo pares para el análisis tridimensional que permite visualizar el ambiente fibro-granular a través del grosor del corte (Fig. 4).



**Figura 4.** Estereopares de micrografías electrónicas del núcleo (N) de *Adiantum capillus-veneris* contrastadas con la tinción convencional (acetato de uranilo-citrato de plomo). Se observan dos etapas de desarrollo: gránulos maduros (flechas rojas) y en estado previo (contorno y flechas punteadas) con fibras asociadas (flechas azules). Citoplasma (Cit), envoltura nuclear (E); ribosomas (flechas verdes); cromatina compacta (CC). 80 000 X.

Mediante el análisis de imágenes estereopares (Fig. 4), se demostró la continuidad entre las fibras y la mayor parte de los gránulos de *Lacandonia* con un tamaño relativamente heterogéneo, es decir, la presencia de gránulos en formación así como partículas de tamaño mayor. En la **figura 4**, los gránulos presentan diferentes estados de maduración considerando la variación de tamaños. En estos aumentos, se distinguen con nitidez dos etapas de desarrollo granular: la etapa madura con gránulos bien definidos y fuertemente contrastados (flechas rojas) y una etapa precedente a éstos (contorno y flechas punteadas). Algo distintivo de las estructuras fibrilares (flechas azules) ligadas a los gránulos inmaduros, es que no solo hay una conexión con los gránulos, sino también con la masa de cromatina contigua. Esto sugiere que posiblemente la cromatina está implicada con la formación de los gránulos.

De igual forma, es evidente que los gránulos se encuentran conectados con la red de fibrillas que los rodean en los espacios intercromatinianos y

pericromatinianos del núcleo. Por otro lado, la heterocromatina se distribuye en forma reticulada, con una “textura” rugosa, uniforme y muy electrodensa. En el citoplasma se distinguen los ribosomas, varios de los cuales se encuentran adheridos a la envoltura nuclear y exhiben un tamaño comparativamente menor, respecto a los gránulos de *Lacandonia*.

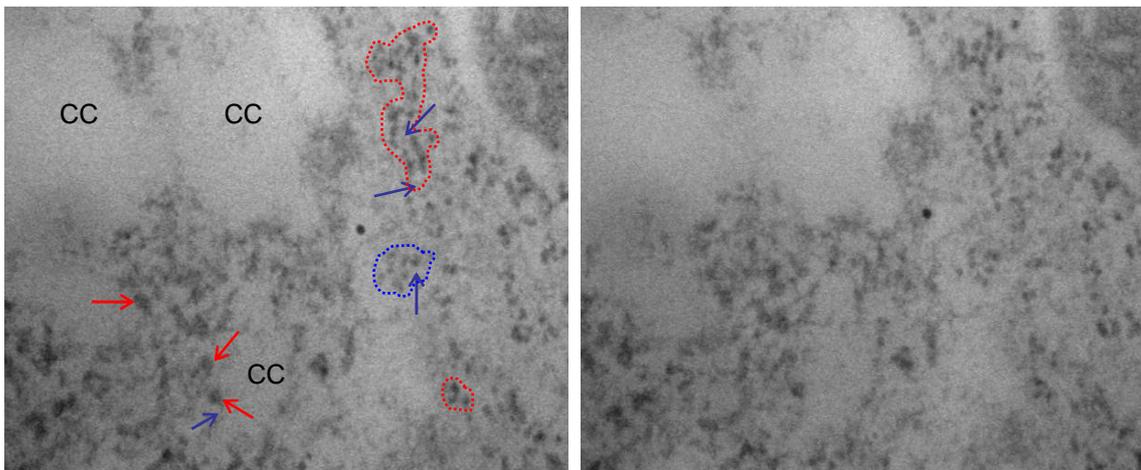
Los gránulos de *Lacandonia* y las fibras que los interconectan son estructuras ribonucleoproteicas. De modo que, para observar tridimensionalmente la relación fibra-gránulo con más precisión y discernir entre los elementos no ribonucleoproteicos presentes en el nucleoplasma, se realizó la técnica de Bernhard (1969) preferencial para ribonucleoproteínas. En las **figuras 5 y 6**, se presentan dos pares de imágenes estéreoapares de cortes contrastados con EDTA provenientes de *A. capillus-veneris*.

En la **figura 5** es posible observar tres diferentes etapas de desarrollo. En la primera etapa de formación (**a**), se visualiza un cúmulo fibro-granular muy cercano a la región de la cromatina que alberga gránulos muy pequeños, poco abundantes y con electrodensidad baja respecto a los otros cúmulos. Asimismo, se distingue una clara asociación con las fibras circundantes.

La segunda etapa de formación (**b**) está representada por la agrupación superior y más extensa, así como por la agrupación inferior con tres gránulos. En estas zonas se observan cúmulos de gránulos abundantes y entrelazados por fibras delgadas, de tamaño y contraste mayor que los anteriores, los cuales comienzan a adoptar una forma definida.

En la tercera etapa de formación (c), se observan gránulos de *Lacandonia* definidos y fuertemente contrastados, los cuales son señalados con las flechas rojas. Estos gránulos maduros se encuentran dispersos, pero adyacentes a las regiones de heterocromatina. Asimismo, es posible observar pequeñas fibras conectadas a éstos que indican una fase terminal en el proceso de formación.

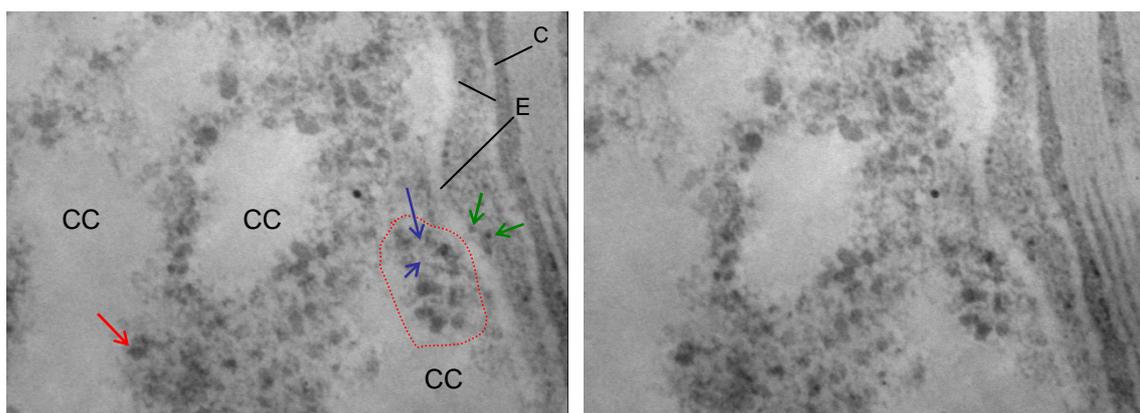
Tanto los gránulos dispersos como los cúmulos se ubican en las regiones pericromatinianas e intercromatinianas del núcleo, percibiéndose las zonas de cromatina como áreas de bajísima densidad electrónica.



**Figura 5.** Estéreo pares de micrografías electrónicas del núcleo de *Adiantum capillus-veneris* contrastado con la tinción preferencial para RNPs con EDTA. Obsérvese las diferentes etapas de desarrollo de los gránulos conectados con fibras (flechas azules): etapa incipiente (contorno punteado azul); etapa intermedia (contornos punteados rojos) y formas maduras (flechas rojas). Cromatina compacta (CC); 80 000 X.

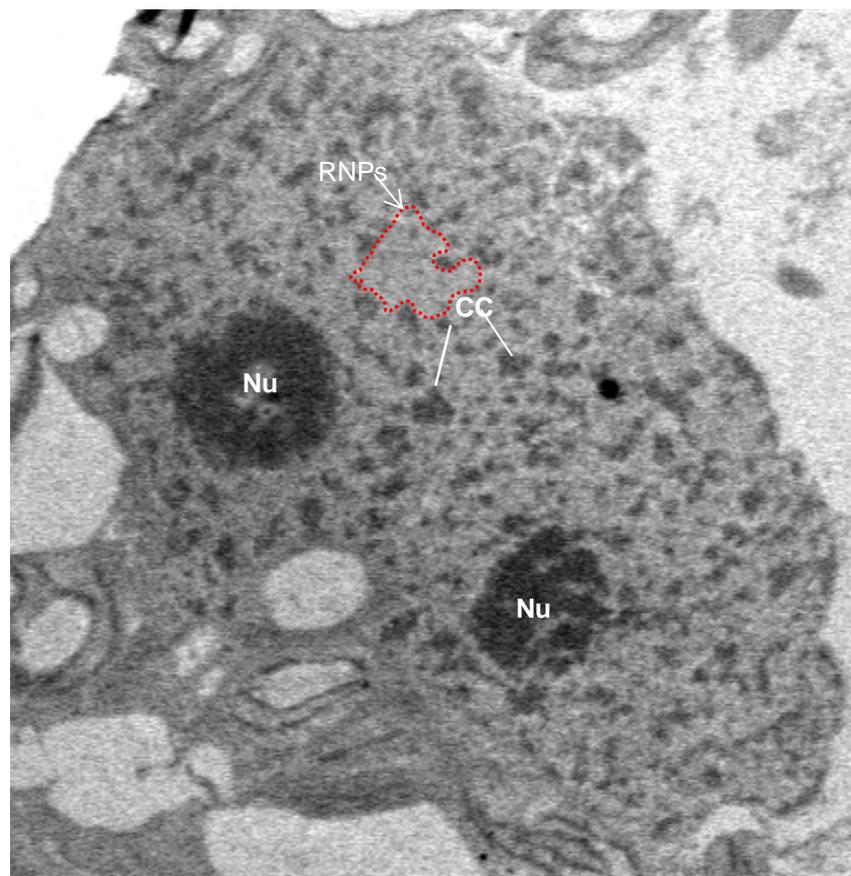
La **figura 6** exhibe gránulos grandes y bien definidos que sobresalen entre otros más pequeños. Son pocos los gránulos que se encuentran aislados, pues la mayor parte de ellos se organizan en forma de “cadena” o en grupos pequeños que varían entre 5 o 6 gránulos. Lo anterior indica que la etapa predominante de los gránulos es aquella en la cual se encuentran asociados a fibras.

En la región inferior izquierda, sobresale un gránulo en cuya periferia se observa una fibrilla que parecería indicar una etapa terminal de formación (señalado con una flecha roja), lo que resalta nuevamente la interconexión fibra-gránulo, así como la hipótesis de que los gránulos de *Lacandonia* se producen a partir del enrollamiento de las fibras. En otras zonas de este campo, hay cúmulos de gránulos muy densos que son difíciles de distinguir entre cada uno de ellos, tal como los que se encuentran debajo de este gránulo grande que indica gránulos en formación. En la región cercana a la envoltura nuclear, se advierte la presencia de otro cúmulo con gránulos bien definidos, donde también son distinguibles los haces fibrilares que los entrelazan. En el exterior del núcleo, entre la envoltura nuclear y la doble membrana del cloroplasto que se vislumbra, existen varios ribosomas considerablemente más pequeños con relación a los gránulos de *Lacandonia*. Es notable que las zonas granulares ocupan las regiones circundantes de los espacios cromatinianos.



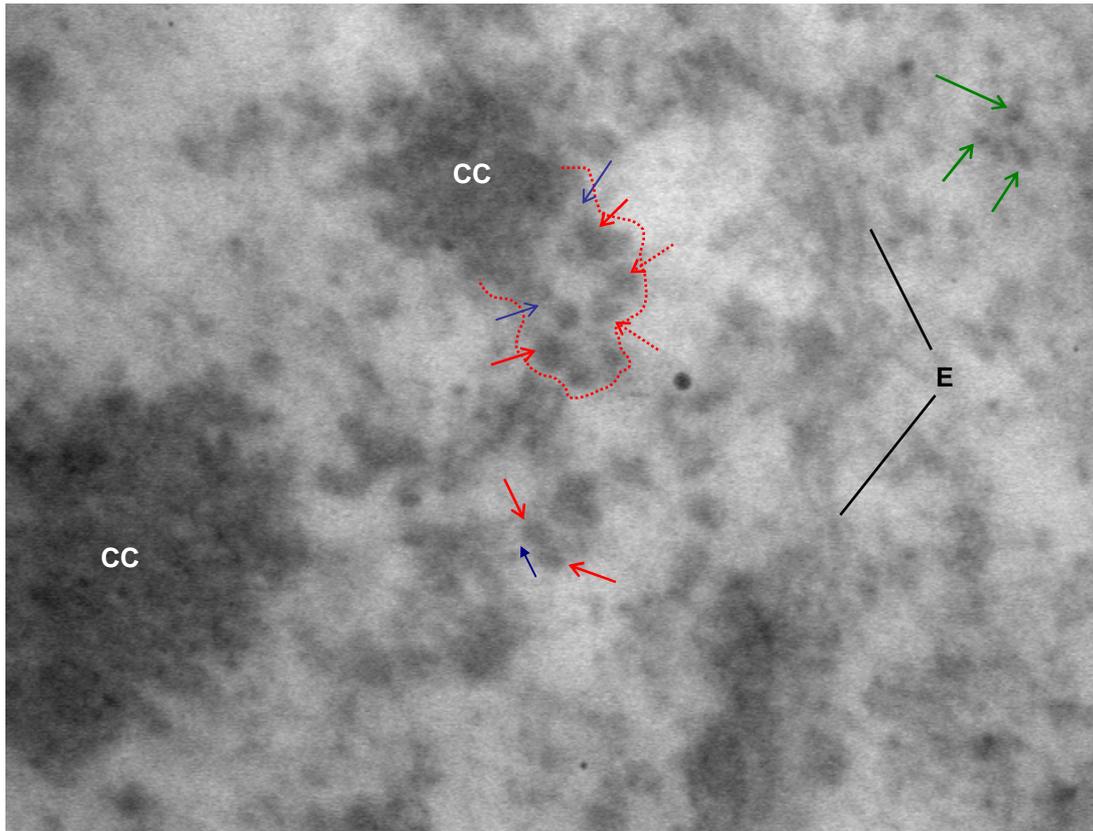
**Figura 6.** Estéreoopares de micrografías electrónicas del núcleo de *Adiantum capillus-veneris* contrastadas por la técnica de Bernhard preferencial para RNPs con EDTA. Obsérvese los cúmulos de gránulos (contorno rojo) entrelazados con las fibras circundantes (flechas azules). También se observa un gránulo prominente y bien definido señalado con una flecha roja. C (cloroplasto); E (envoltura nuclear); ribosomas (flechas verdes); cromatina compacta (CC). 80 000 X.

En el caso de *E. hyemale L*, el núcleo celular (Fig. 7) presenta una forma irregular, pero con tendencia a ser alargada y ovalada, con uno o dos nucléolos prominentes de contraste intenso. La cromatina se distribuye por todo el organelo formando una red, por lo que se trata de un núcleo reticulado. En el nucleoplasma se observa la cromatina en forma de “parches” dispersos por todo el núcleo, con un fuerte contraste y rodeados de múltiples elementos fibrogranulares, cuyas zonas se distinguen por ser mucho menos electrodensas que la cromatina, presentando un tono gris-claro. Esta zona enmarcada con rojo en la **figura 7** donde se localizan los gránulos de *Lacandonia* y en donde ocurre la biogénesis ultraestructural de los mismos.



**Figura 7.** Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *Equisetum hyemale L*, contrastado con la técnica convencional para MET de acetato de uranilo y citrato de plomo. Zona de interés para RNPs (flecha y contorno rojo). Nucléolo (Nu); cromatina compacta (CC). 4000 X.

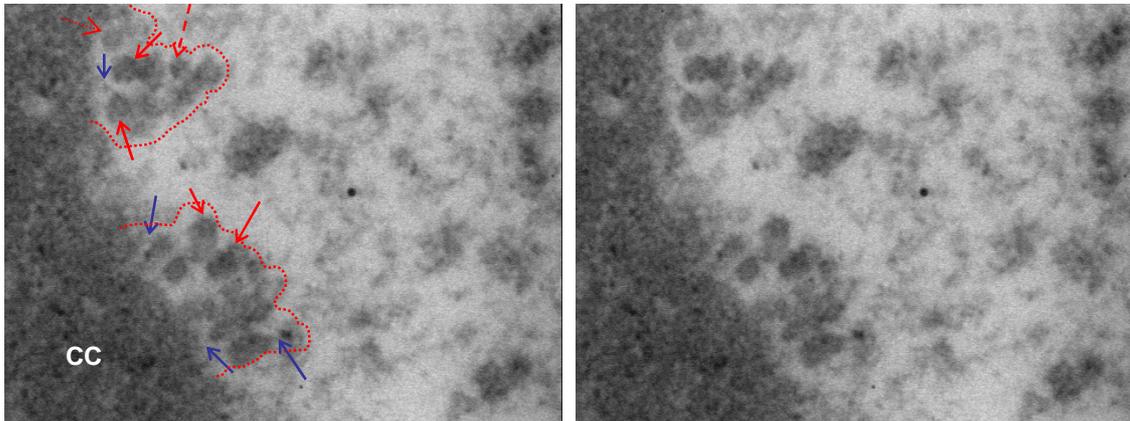
A mayores aumentos, las zonas fibro-granulares del núcleo de *E. hyemale* L presenta al igual que el núcleo de *A. capillus-veneris*, una distribución fibro-granular en forma de cúmulos, tal como se observa en la **figura 8**. El cúmulo señalado en esta imagen figuran básicamente dos tipos de gránulos: a) unos gránulos pequeños y de baja densidad electrónica en etapa inmadura; b) gránulos con un tamaño aproximadamente tres veces más grandes que los ribosomas señalados, fuertemente contrastados y bien definidos, característicos de una etapa de desarrollo madura. Ambos tipos de gránulos se encuentran conectados con las fibrillas circundantes, además de conectarse con las fibras que se encuentran adyacentes con la zona de heterocromatina, lo que vuelve a sugerir un posible origen de los gránulos a partir de fibras que provienen de la cromatina. Por debajo del cúmulo indicado, sobresalen dos gránulos cercanos entre sí, pero independientes de cualquier aglomeración granular. De igual manera, se observan las conexiones fibrilares alrededor de éstos.



**Figura 8.** Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de *Equisetum hyemale L* contrastado con la tinción convencional (acetato de uranilo-citrato de plomo). El núcleo exhibe los gránulos de *Lacandonia* en cúmulos (contorno rojo) y en diferentes etapas de desarrollo: etapa intermedia (flechas punteadas) y madura (flechas rojas) vinculados con fibras (flechas azules). Envoltura nuclear (E); cromatina compacta (CC); ribosomas (flechas verdes); 80 000 X.

Al igual que en *A. capillus-veneris*, los núcleos de *E. hyemale L* fueron tratados primeramente con la tinción de contraste general para la obtención de las imágenes estéreopares con mayores aumentos. El núcleo contrastado con la técnica convencional de acetato de uranilo y citrato de plomo que muestra la **figura 9**, muestra claramente dos cúmulos granulares en donde confluyen gránulos en tres diferentes etapas de formación tal como ocurre en los núcleos de *A. capillus-veneris*, de acuerdo con su tamaño: gránulos de formación incipiente (flechas punteadas), gránulos intermedios (flechas interrumpidas) y gránulos maduros (flechas rojas); los tres tipos granulares se encuentran interconectados con las fibras circundantes en la región pericromatiniana. También es posible observar múltiples haces fibrilares distribuidos de manera

aleatoria en la región intercromatiniana, aunque sin gránulos adheridos a éstos. De nueva cuenta, es notable que los dos cúmulos identificados se encuentran muy próximos a la región de la cromatina.

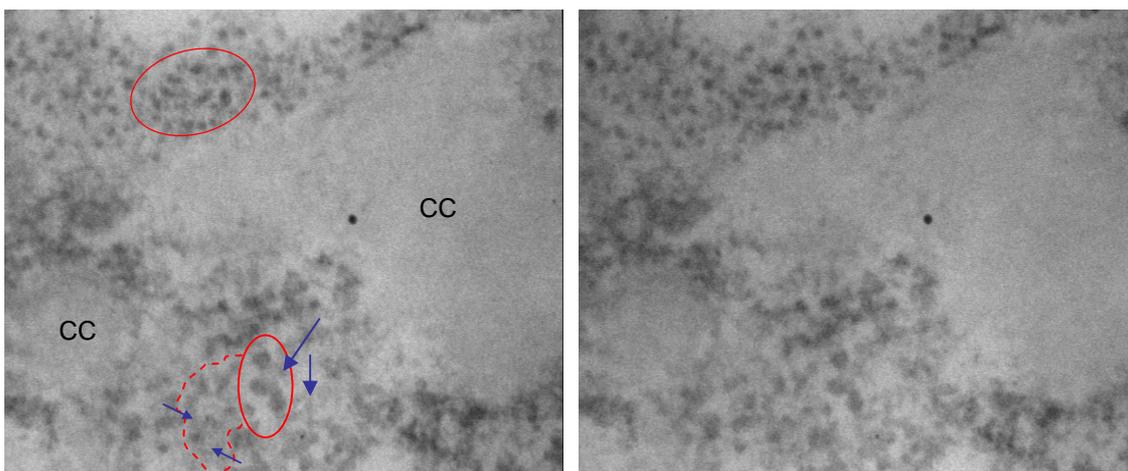


**Figura 9.** Estéreopares de micrografías electrónicas del núcleo de *Equisetum hyemale L* contrastadas por la tinción convencional (acetato de uranilo y citrato de plomo). Se observan cúmulos de gránulos (contornos rojos) asociados con fibras (flechas azules). Los gránulos presentan diferentes etapas de desarrollo: formación incipiente (flecha interrumpida), etapa intermedia (flecha punteada) y etapa madura (flechas rojas). Cromatina compacta (CC). 150 000 X.

Con el fin de resaltar solo las estructuras ribonucleoproteicas de los núcleos de *E. hyemale L*, se utilizó la técnica de Bernhard preferencial para RNPs. La **figura 10** exhibe dos cúmulos granulares. El primero de ellos ubicado en la parte superior de la imagen, es un cúmulo con abundantes gránulos donde existe una heterogeneidad de tamaños, que sugiere tres diferentes etapas de biogénesis ultraestructural: de formación incipiente (**a**), intermedios (**b**) y maduros (**c**). Las fibras nuevamente se hacen presentes al entrelazarse con los gránulos y conectarlos entre ellos, formando una red fibro-granular en las regiones pericromatinianas e intercromatinianas. En la parte inferior, la etapa **c** se manifiesta como un cúmulo pequeño de tres gránulos grandes y bien delimitados, enlazados entre sí por el material fibroso que se extiende hacia

abajo conectando a otros gránulos más pequeños que adoptan la forma de “collar de cuentas” enroscado.

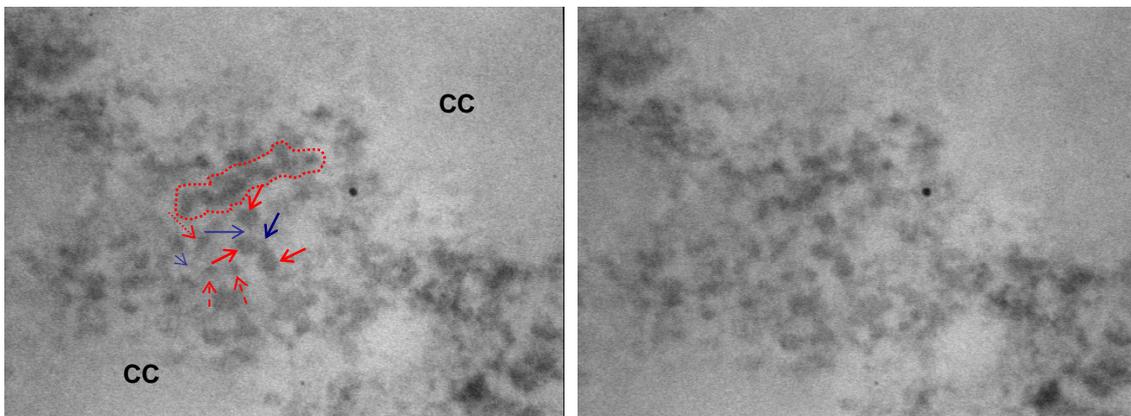
En la parte izquierda respecto a los tres gránulos grandes, se advierte la formación de gránulos **a** y **b** de tamaño menor y con un claro medio fibroso. Se ven dos campos, uno en el que resaltan los gránulos y otro en el que las fibras se perciben en el fondo del campo visual. En el lado derecho y debajo de la cromatina, se observan algunos gránulos en formación que apenas se alcanzan a percibir, sin embargo, es posible captar la asociación de las fibras con estas estructuras.



**Figura 10.** Estéreopares de micrografías electrónicas del núcleo de *Equisetum hyemale L* contrastadas por la técnica de Bernhard preferencial para RNPs con EDTA. Obsérvese los cúmulos granulares (contornos rojos) en donde hay gránulos de diferentes tamaños e interconectados con fibras (flechas azules). Cromatina compacta (CC); 100 000 X.

Con la finalidad de apreciar con mayor detalle el cúmulo de los tres gránulos grandes, se obtuvieron a mayor aumento las imágenes estéreopares que se muestran en la **figura 11**. En estas imágenes se puede apreciar con más nitidez una aglomeración de gránulos en la parte central, contrastados fuertemente en comparación con la cromatina circundante, la cual se observa mucho menos electrodensa, percibida en gris claro y homogéneo. En la parte

superior del cúmulo, se aprecia una hilera de gránulos tanto en formación como ya maduros, rodeados por un ambiente fibroso. Por debajo de esta hilera granular, se distinguen tres gránulos bien delimitados con unas cuantas fibras adheridas por el lado derecho. Un poco más abajo también se observan gránulos pero mucho más pequeños, probablemente en proceso de formación. Asimismo, de lado izquierdo se detectan otros gránulos pequeños en formación con sus fibras circundantes que se aprecian con más claridad. Estos gránulos se encuentran inmersos en una red de filamentos pequeños y delgados.



**Figura 11.** Estéreopares de micrografías electrónicas del núcleo de *Equisetum hyemale L* contrastadas por la tinción de Bernhard preferencial para RNPs con EDTA. Obsérvese las tres etapas granulares: etapa incipiente (flecha interrumpida), etapa intermedia (flecha punteada) y etapa madura (flecha roja), en las cuales los gránulos están vinculados con las fibras circundantes (flechas azules). Cúmulo granular (contorno rojo punteado); cromatina compacta (CC). 120 000 X.

## XI. DISCUSIÓN

El descubrimiento de la especie *L. schismatica* ofreció un terreno fértil para la realización de análisis a diferentes niveles biológicos, desde el ecológico hasta el estudio del núcleo celular, en el cual Jiménez-García, L. F. y col. (1992) descubrieron un nuevo tipo de partículas ribonucleoproteicas no nucleolares: los *gránulos de Lacandonia*. Estas estructuras fueron observadas en los núcleos reticulados de *L. schismatica*, perteneciente al orden de las Triuridales que a su vez se clasifican en la categoría de plantas monocotiledóneas.

El rango de distribución de los gránulos de *Lacandonia* en el reino Plantae es amplio, de tal forma que es posible encontrarlos en angiospermas como Triuridales, en especies de gimnospermas pertenecientes a Cycadophyta, Ginkgophyta y Coniferophyta, hasta grupos más tempranos de plantas sin semilla como Pteridophyta y Equisetophyta, cuyos núcleos fueron objeto del presente estudio. Incluso, se presume su existencia en organismos precursores de las plantas como es el caso de las algas del género *Choleochaete* (Jiménez-Ramírez, J. Tesis doctoral, datos aún no publicados).

Los núcleos celulares tanto del helecho *A. capillus-veneris* como del equiseto *E. hyemale* L son morfológicamente muy similares, debido a su cercanía filogenética (Knox, P. J. 2008, Chase, M. W. y Fay, M. F. 2001). Los dos núcleos exhiben formas asimétricas o irregulares, pero con una tendencia a ser ovalados. Pueden presentar más de un nucléolo y en cuanto a su organización macromolecular, ambos presentan una distribución reticulada de la cromatina.

El núcleo reticulado es un rasgo compartido con otros núcleos provenientes de plantas monocotiledóneas, tales como: *L. schismatica*, *T. alata* (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992), *T. brevistylis* A. *cepa*, *Allium porrum* y gimnospermas como *Ginkgo biloba*, entre otras (Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002). Cabe señalar que en los núcleos reticulados, se describieron por primera vez la mayor parte de los componentes ribonucleoproteicos no nucleolares (en Echeverría, O. *et al.* 1999).

Entre los rasgos más distintivos que manifiestan los gránulos de *Lacandonia* tanto en *A. capillus-veneris* como en *E. hyemale* L, está su tendencia a formar cúmulos, un patrón de organización previa y claramente identificado en otras especies representativas como *L. schismatica* (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992) o *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002, Gaona-López, C. Tesis. 2008). Las micrografías electrónicas de *Ginkgo biloba*, muestran a los gránulos de *Lacandonia* en arreglos grupales ubicados en la región pericromatiniana o intercromatiniana. Asimismo, las estructuras granulares no son las únicas que conforman al cúmulo, sino que éstas parecen estar interconectadas entre sí por fibrillas (Ramírez, J. *et al.* 2002, Gaona-López, C. Tesis. 2008), tal como se observa en *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L.

En *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L, los gránulos de *Lacandonia* presentan un patrón de formación similar a lo reportado en especies con semilla, ya que las micrografías electrónicas de núcleos tratados con la tinción convencional como con la preferencial para RNPs, indican una estrecha asociación fibrogranular que sugiere que la formación de los gránulos de *Lacandonia* tiene su origen en

el enrollamiento de las fibras nucleares, tal como sugiere Gaona-López, C. (Tesis. 2008).

En los resultados obtenidos para ambas especies, se encontraron básicamente tres estadios de formación de los gránulos de *Lacandonia*, de acuerdo con la heterogeneidad de sus tamaños y niveles de densidad electrónica: a) gránulos en etapa incipiente de desarrollo, b) gránulos intermedios y c) gránulos maduros. Las tres etapas pueden confluir en un mismo cúmulo y todos están conectados con los haces fibrilares que los rodean.

El patrón de biogénesis ultraestructural encontrado para *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L confirma lo planteado en la hipótesis nula, respecto que el modo de desarrollo de los gránulos de *Lacandonia* es similar al que presentan las plantas con semilla. Con base en el trabajo de Gaona-López, C. (Tesis. 2008), en la especie *Ginkgo biloba* también existe una estrecha asociación fibrogranular y fundamentalmente tres etapas de formación del gránulo (de acuerdo a las variaciones de tamaños), siendo más abundante el primer estadio, el cual representa a los gránulos de formación incipiente.

La comparación cualitativa de los núcleos analizados en este trabajo, indica una abundancia relativamente más baja de gránulos en comparación con las especies de *L. schismatica* (Agredano-Moreno, *et al.* 2000) o *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, J. *et al.* 2002). Probablemente, debido a que las pteridofitas y equisetales no presentan procesos tan complejos como el desarrollo floral y/o la producción de semilla.

La comparación de dos procedimientos de contraste: la tinción convencional para microscopía electrónica de transmisión (MET) con acetato de uranilo y citrato de plomo, así como la tinción preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) con EDTA (Monneron, A. y Bernhard, W. 1969), permitió dilucidar que los gránulos de *Lacandonia* se encuentran formando redes fibro-granulares. Posteriormente, se recurrió a la utilización de imágenes estéreopares para lograr un efecto tridimensional que resaltara dicha asociación estructural. Una vez obtenidas las imágenes estéreopares, se analizaron con unos lentes estéreoscópicos especiales para que el cerebro humano reciba el efecto virtual, o bien, mediante la aplicación del programa *Anaglyph maker* para generar un anaglifo, a partir de la yuxtaposición de ambas imágenes. Sin embargo, se logró un mejor resultado con la primera opción.

Los estéreopares de las micrografías electrónicas obtenidas para ambas especies, confieren nuevas observaciones sugerentes respecto al origen de los gránulos de *Lacandonia*. El surgimiento de estas partículas, se relaciona con el plegamiento de una o varias fibras ribonucleoproteicas, tal como ocurre en los PCGs de mamífero. Los PCGs se consideran estructuras que representan la contraparte morfológica de la transcripción y de los eventos postranscripcionales, fenómenos relacionados con las primeras manifestaciones del fenotipo casi universales para los eucariontes (Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992). A nivel ultraestructural, los gránulos de *Lacandonia* están relacionados no sólo con los PCGs, sino con los GBs ubicados en la glándula salival del insecto *Chironomus tentans*, de acuerdo con pruebas de

morfología, inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y sensibilidad enzimática (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 1994, 2000).

La relación que los gránulos de *Lacandonia* guardan con los PCGs, estriba en los siguientes aspectos. Uno es que, la abundancia de los gránulos está en función de las etapas de diferenciación celular y de los estadios de desarrollo del organismo en cuestión. Para el caso de las plantas, Agredano-Moreno, L. T. y col. (2000) observaron que el número de gránulos de *Lacandonia* variaban considerablemente con relación al estado de pre-antesis o post-antesis de las flores de *L. schismatica*. A nivel molecular, las pruebas cito e inmunoquímicas han detectado la presencia de RNAs con colas de poli-A en gránulos de *Lacandonia* (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 2000), tal como presentan los PCGs analizados por Visa, N. *et al.* (1993). De aquí se deduce que, ambas partículas contienen mRNAs de alto peso molecular.

La relación de los gránulos de *Lacandonia* con los GBs se basa principalmente en que ambos contienen proteínas SR, de acuerdo con lo arrojado por las pruebas de inmunolocalización con el anticuerpo 3C5 en los gránulos de *Lacandonia* (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 2000). En los GBs, las proteínas SR están implicadas en el proceso de *splicing* y en el transporte del mRNA hacia el citoplasma celular (Alzhanova-Ericsson, A. T. *et al.* 1996). En el caso de los gránulos de *Lacandonia*, se sugiere que las proteínas SR juegan un papel diferente al proceso de *splicing*, que más bien su función es de tipo estructural, o bien, puede estar relacionada con los eventos de almacén y transporte de mRNA (Agredano-Moreno, L. T. *et al.* 2000).

La presencia de los gránulos de *Lacandonia* en varios taxa de plantas, constituye una sinapomorfía. Un carácter conservado a lo largo de la evolución de la vida, derivado de un evento macroevolutivo suscitado a nivel de núcleo celular en diferentes grupos florísticos. Tales como las especies seleccionadas para este trabajo, emergidas hace 300-370 millones de años. De manera que, el presente estudio aporta evidencias respecto a la presencia, extensión y biogénesis ultraestructural de esta sinapomorfía para el caso concreto del reino Plantae.

## **XII. CONCLUSIONES**

Los núcleos de *A. capillus-veneris* y de *E. hyemale* L son reticulados y muestran formas irregulares, con un nucleoplasma muy parecido en cuanto a la distribución y densidad fibro-granular.

La reconstrucción tridimensional realizada a partir de imágenes estéreo pares, permitió mostrar que los gránulos de *Lacandonia* se originan a partir del enrollamiento de las fibras circundantes. También permitió dilucidar al menos tres tamaños diferentes de los gránulos de *Lacandonia*, sugiriendo la existencia de estadios distintos de maduración de los mismos.

El patrón de biogénesis ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* de *A. capillus-veneris* y *E. hyemale* L, es similar al encontrado en especies que producen semilla como *G. biloba*, lo que expresa su conservación en especies precedentes con 300 y 370 millones de años de antigüedad.

### XIII. 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: 177-84.

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. 2001. Los Gránulos de *Lacandonia*. Caracterización por Medio de Inmunolocalización e Hibridación *In Situ* Ultraestructural y Aislamiento 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.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P., 2002. *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 "Ahuehuete" (*Taxodium mucronatum*). Trabajo de Investigación. Especialista en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas. UNAM.

Alzhanova-Ericsson, A. T., Sun, X., Visa, N., Kiseleva, E., Wurtz, T. y Daneholt, B. 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.

Ambrose, B. A., Espinoza-Matías, S., Vázquez-Santana, S., Vergara-Silva, F., Martínez, E., Márquez-Guzmán, J. y Alvarez-Buylla, E. R. 2006. Comparative Developmental Series of the Mexican Triurids Support a Euanthial Interpretation for the Unusual Reproductive Axes of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *Am. J. Bot.* 93: 15-35.

Bachellerie, J. P., Puvion, E. y Zalta, J. P. 1975. Ultrastructural Organization and Biochemical Characterization of Chromatin RNA Protein Complexes Isolated from Mammalian Cell Nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58: 327-37.

Barlow, P. W. 1977. Determinants of Nuclear Chromatin Structure in Angiosperms. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 18: 193-206.

Bernhard, W. 1969. A New Staining Procedure for Electron Microscopical Cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-65.

Blencowe, B. J., Issner, R., Kim, J., McCaw, P., Sharp, P. A. 1995. New Proteins Related to the Ser-Arg Family of *Splicing* Factors. *RNA.* 1: 852-65.

Chase, M. W. y Fay, M. F. 2001. Minireview. Ancient Flowering Plants: DNA Sequences and Angiosperm Classification. *Genome Biol.* 2: 1012.1-1012.4.

Dundr, M. y Misteli, T. 2001. Functional Architecture in the Cell Nucleus. *Biochem. J.* 356: 297-310.

Echeverría, O., Moreno-Díaz de la Espina, S., Jiménez-García, L. F. y Vázquez-Nin, G. H. 1999. Supramolecular Organization of a Chromocentric Plant Nucleus. *Biol. Cell.* 91: 209-19.

Esponda, P. 1977. Fine Structure of Synaptonemal-like Complexes in *Allium cepa* Microspores. *Protoplasma* 93: 1-6.

Fakan, S., Puvion, E. y Spohr, G. 1976. Localization and Characterization of Newly Synthesized Nuclear RNA in Isolated Rat Hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99: 155-164.

Fakan, S., Leser, G. y Martin, T. E. 1984. Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins as Visualized by Immunocytochemistry on Thin Sections. *J. Cell Biol.* 198: 358-363.

Fakan, S. 1994. Perichromatin Fibrils are *In Situ* Forms of Nascent Transcripts. *Trends Cell Biol.* 4: 86-90.

Gall, J. G. 2000. Cajal Bodies: The First 100 Years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273-300.

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.

Harris, H. 1999. *The Birth of the Cell*. New Haven: Yale University Press.

Hauke, R. L. 1995. Equisetaceae. En: Davidse, G., Sousa, M. S. y Knapp, S. (eds.). *Flora Mesoamericana*. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Huang, S., Deerinck, J., Ellisman, M. H. y Spector, D. L. 1994. *In Vivo* Analysis of the Stability and Transport of Nuclear Poly (A)<sup>+</sup> RNA. *J. Cell Biol.* 126: 877-99.

Jiménez-García, L. F., Agredano-Moreno, L. T., Segura-Valdez, M. de L., Echeverría, O. M., Martínez, E., Ramos, C.H. y Vázquez-Nin, G.H. 1992. The Ultrastructural Study of the Interphase Nucleus of *Lacandonia schismatica* (*Lacandoniaceae*:Triuridales) Reveals A Non-Typical Extranucleolar Particle. *Biol. Cell* 75: 101-10.

Jiménez-García, L. F., Reynoso-Robles, R., Fragoso-Soriano, R., Agredano-Moreno, L. T., Segura-Valdez, M. L., González-Moreno, S., Ramos, C. H. y Martínez, E. 1998. *Biología Celular de Lacandonia schismatica*. Análisis por Microscopía Electrónica y de Fuerza Atómica *Bol. Soc. Bot. Méx.* 62: 5-14.

Jiménez-García, L. F. y Fragoso-Soriano, R. 2000. Atomic Force Microscopy of the Cell Nucleus. *J. Struct. Biol.* 129: 218-22.

Jiménez-García, L. F. y Merchant-Larios, H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación, México, 853 p.

- 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.
- Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L. T., Segura-Valdez, M. L. y Jiménez-García, L. F. 2002. *Lacandonia* Granules Are Present In *Ginkgo biloba*. Cell Nuclei. Biol. Cell 94: 511-18.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. y Donoghue, M. J. 2002. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. 2a ed. Sinauer Associates, Estados Unidos.
- Knox, P. J. 2008. Mapping the Walls of the Kingdom: The View from the Horsetails. New Phytol. 179: 1-3.
- Lamond, A. I. y Spector, D. L. 2003. Nuclear Speckles: A Model for Nuclear Organelles. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4: 605-612.
- López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. L., Alcántara-Ortigoza, M. A. y Jiménez-García, L. F. 1998. Localization of Intranuclear RNA by Electron Microscopy *In Situ* Hybridization Using a Genomic DNA Probe. Arch. Med. Res. 29: 185-90.
- Manley, J. L. y Tacke, R. 1996. SR Proteins and *Splicing* Control. Genes. Dev. 13: 1569-79.
- Márquez-Guzmán, J., Engleman, M., Martínez-Mena, A., Martínez, E., Ramos, C. H. 1989. Anatomía Reproductiva de *Lacandonia schismatica* (*Lacandoniaceae*). Ann. Mo. Bot. Gard. 76: 124-27.
- Márquez-Guzmán, J., Vázquez-Santana, S., Engleman, E. M., Martínez-Mena, A., Martínez, E. 1993. Pollen Development and Fertilization in *Lacandonia schismatica* (*Lacandoniaceae*). Ann. MO Bot. Gard. 76: 124-26.
- Martínez, E. y Ramos, C. H. 1989. *Lacandoniaceae* (Triuridales): Una Nueva Familia de México. Ann. Miss. Bot. Gard. 76: 128-35.
- McVaugh, R., 1992. Gymnosperms and Pteridophytes. W. R. Anderson (ed.). A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico, Vol. 17. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Mickel, J. T. y Smith, A. R., 2004. The Pteridophytes of Mexico. Memoirs of the New York Botanical Garden: 1-1054.
- Moir, R. D, Spann, T. P., López-Soler, R. I., Yoon, M., Goldman, A. E., Khuon, S. y Goldman, R. D. 2000. Review: The Dynamics of the Nuclear Lamins During the Cell Cycle-Relationship Between Structure and Function. J. Struct. Biol. 129: 324-34.
- Monneron, A. y Bernhard, W. 1969. Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells. J. Ultrast. Res. 27: 266-288.
- Moses, M. J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J. Biochem. Cytol. 2: 215-218.

- Palacios-Ríos, M. 1992. Dicksoniaceae, Equisetaceae, Gleicheniaceae, Lindsaeaceae, Parkeriaceae, Plagiogyriaceae, Vittariaceae. En: Sosa, V., Cabrera, L., Duncan, R. T., Mejía-Saulés, M. T., Moreno, N. P., Nee, M., Nevling, L. I., Rzedowski, J., Schubert, B. G., Gómez-Pompa, A. (eds.). Flora de Veracruz. Fascículo 69. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
- Puvion, E. y Moyne, G. 1981. *In Situ* Localization of RNA structures. En: The Cell Nucleus. H. Busch. (Eds.). Academic Press. Nueva York. pp. 59-115.
- Puvion, E., Viron, A., Assens, C., Leduc, E. H. y Jeanteur, P. 1984. Immunocytochemical Identification of Nuclear Structures Containing snRNPs in Isolated Liver Cells. J. Ultrastruct. Res. 87: 180-189.
- Recillas-Targa, F. y Escamilla Del Arenal, M. 2004. Participación de la Estructura de la Cromatina en la Regulación de la Expresión Génica. Mensaje Bioquímico. 28: 173-200.
- Saitoh, N., Spahr, C. S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A. F. y Spector, D. L. 2004. Proteomic Analysis of Interchromatin Granules Clusters. Mol. Biol. Cell 15: 3876-3809.
- Schneider H, Schuettpels E, Pryer KM, Cranfill R, Magallón S y Lupia, R. 2004. Ferns Diversified in the Shadow Of Angiosperms. Nature 428: 553–557.
- Shaw, J. P. y Brown WS. J. 2004. Plant Nuclear Bodies. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 14-620.
- Smith, A. R. y Pryer, K. M. 2006. A Classification for Extant Ferns. Taxon(55):705-731.
- Spector, D. L. 1993. Macromolecular Domains Within the Cell Nucleus. Ann. Rev. Cell Biol. 9: 265-315.
- Spector, D. L. 2001. Nuclear Domains. J. Cell Sci. 114 (Pt 16): 2891-2893.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. y Aebi, U. 1999. The Nuclear Pore Complex: From Molecular Architecture to Functional Dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. 11: 391-401.
- Thiry, M. y Lafontaine, D. L. 2005. Birth of a Nucleolus: The Evolution of Nucleolar Compart. Trends Cell Biol. 15: 194-9.
- 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., Echeverría, O. M., Molina, E. y Fragoso, J. 1978. Effects of Ovarioectomy and Estradiol Injection on Nuclear Structures of Endometrial Epithelial Cells. Biol. Cell. 35: 221-28.
- Vázquez Nin, G. H., Echeverría, O. M., Fakan, S. Leser G., Martin, T. E. 1990. Immunoelectron Microscope Localization of snRNPs in the Polytene Nucleus of Salivary Glands of *Chironomus thummi*. Chromosoma 99: 44-51.
- Vázquez-Nin, G. H. y Echeverría, O. M. 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., Jiménez-García, L. F., Echeverría, O. M., Guzmán, A., Coeto-Barona, G., 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.

Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Harper, F., Bachellerie, J. P. y Puvion, E. 1993. Intranuclear Distribution of Poly(A)RNA Determined by Electron Microscope *In Situ* Hybridization. *Exp. Cell Res.* 208: 19-34.

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.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2006. *Biología Molecular del Gen.* 5a ed. Editorial Médica Panamericana, S. A. España. 776 pp.

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.