

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



**CARACTERIZACIÓN IN SITU MEDIANTE SONDAS  
MOLECULARES DEL PROCESO DE INDUCCIÓN DE  
EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN EN *CAPSICUM ANNUUM* L.**

TESIS DOCTORAL DE

**PABLO GONZÁLEZ-MELENDI DE LEÓN**

VºBº  
LA DIRECTORA DE TESIS

VºBº  
LA TUTORA DE TESIS

FDO. DRA. M.C. RISUEÑO

FDO. DRA. B. GONZÁLEZ GALLO

**21.163**

MADRID, JUNIO 1996



Archivo

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

**GRUPO DE ORGANIZACIÓN NUCLEAR DURANTE EL DESARROLLO DE PLANTAS**

**MARÍA CARMEN RISUEÑO ALMEIDA** INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

**CERTIFICA**, QUE LA TESIS DOCTORAL TITULADA **CARACTERIZACIÓN**  
IN SITU MEDIANTE SONDAS MOLECULARES DEL PROCESO DE INDUCCIÓN DE  
EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN EN *CAPSICUM ANNUUM L.*, REALIZADA POR EL  
LICENCIADO PABLO GONZÁLEZ-MELENDE DE LEÓN EN EL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CSIC) BAJO SU DIRECCIÓN, REÚNE TODAS  
LAS CONDICIONES PARA OPTAR AL GRADO DE **DOCTOR EN CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS**.

MADRID, A 11 DE JUNIO DE 1996

A handwritten signature in black ink, reading "María C. Risueño Almeida". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping flourish at the end.

FDO. DRA. M. CARMEN RISUEÑO ALMEIDA

*A mis padres*

# AGRADECIMIENTOS

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer su apoyo y ayuda a las siguientes personas,

A MariCarmen Risueño, directora de este trabajo por la confianza que ha depositado en mi, la amplia formación que me ha dado y el tiempo que me ha dedicado para poder llegar hasta aquí.

A Blanca González Gallo, por aceptar ser tutora de esta Tesis.

A Pilar S. Testillano, de quien he aprendido mucho de lo que sé de microscopía, por todo el trabajo compartido y bien llevado y las enriquecedoras discusiones de resultados.

A Begoña Fadón, quien me pasó el testigo de los cultivos de polen.

A Roberto Rodríguez, por introducirme en el mundo de la investigación.

A Adela Olmedilla, Carlos Almarza, Concha G. Mena, Pari Ahmadian, Jesús Reyes, Lupe Préstamo y Jesús Redondo, compañeros de laboratorio, por su colaboración en algunos experimentos, el trabajo compartido y el día a día.

A Marigel Ollacarizqueta, por su buena disposición para echar siempre una mano y sus enseñanzas en el manejo de los microscopios electrónico y confocal.

A José Blanco por sus magníficas fotos, el interés mostrado en nuestro trabajo y su esfuerzo por realizar las copias fotográficas de las láminas de esta tesis.

A Amelia Sánchez-Pina, Maribel Rodríguez-García, MariCarmen Fernández, Charo de Felipe y Consuelo de la Torre por su constante apoyo y estímulo.

A Nuria Vilaboa, por su amistad.

A mis compañeros del CIB, en especial a Natalia, Jon y las chicas de la 4248, Nurial, Laura y Concha.

---

A Edmond y Francine Puvion (Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif, Francia), Erwin Heberle-Bors y Oscar Vicente (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Viena, Austria), Jean-Pierre Bachellerie (Institut de Biologie Cellulaire et de Génétique, Toulouse, Francia) y Peter Shaw (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido), por aceptarme en su respectivos laboratorios donde he aprendido técnicas y obtenido resultados incluidos en esta Tesis. Merci, Danke, Thanks.

Este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca de FPI del MEC y una beca con cargo a proyecto de la CAM, y financiado por los proyectos DGICYT PB87-0332-C02-01 y PB92-0079-C03-01.

---

## ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. EL PIMIENTO	2
2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL PROGRAMA DE DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN	2
3. DESARROLLO GAMETOFÍTICO DEL GRANO DE POLEN	3
4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA MADURACIÓN IN VITRO DE MICROSPORAS Y POLEN INMADURO	7
5. CULTIVO IN VITRO DE MICROSPORAS Y GRANOS DE POLEN PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES HAPLOIDES	9
6. EL NÚCLEO CELULAR	12
<b>OBJETIVOS</b>	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>MATERIALES</b>	
1. GRANOS DE POLEN DE PIMIENTO	16
2. MERISTEMOS DE RAÍZ DE CEBOLLA	16
<b>MÉTODOS</b>	
1. INCORPORACIÓN IN VIVO DE BrdU	18
2. PROCESAMIENTO CONVENCIONAL DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	18
2.1. <u>Fijación</u>	18
2.1.1. Fijador Karnovsky	18
2.1.2. Tetróxido de Osmio	19
2.2. <u>Deshidratación</u>	20
2.3. <u>Infiltración</u>	20
2.4. <u>Polimerización</u>	21
3. CRIOPROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	21
3.1. <u>Fijación</u>	21
3.2. <u>Deshidratación</u>	22
3.3. <u>Infiltración</u>	22
3.4. <u>Inclusión y polimerización</u>	22
4. OBTENCIÓN DE CORTES SEMIFINOS Y ULTRAFINOS	23

---

4.1. <u>Cortes semifinos</u>	23
4.2. <u>Tallado</u>	23
4.3. <u>Recubrimiento de rejillas</u>	24
4.4. <u>Cortes ultrafinos</u>	24
4.5. <u>Tinción de cortes ultrafinos con uranilo y plomo</u>	25
4.5.1. Preparación de acetato de uranilo	25
4.5.2. Preparación de citrato de plomo	25
4.5.3. Tinción con uranilo y plomo	25
5. CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES	26
5.1. <u>Método de metilación-acetilación (MA) para ácidos nucleicos</u>	26
5.2. <u>Citoquímica NAMA-Ur específica para DNA</u>	26
5.3. <u>Tinción regresiva de EDTA</u>	27
5.4. <u>Digestión con DNasa I</u>	28
6. INMUNOCITOQUÍMICAS A NIVEL DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	28
7. REACCIÓN DE TERMINAL DEOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA (TdT) IN SITU	30
8. OBTENCIÓN Y MARCADO DE SONDAS RIBOSÓMICAS PARA HIBRIDACIÓN IN SITU	31
8.1. <u>Obtención de las sondas</u>	31
8.1.1. Transformación bacteriana	32
8.1.2. Preparación de DNA plasmídico	33
8.1.2.1. Crecimiento, recolección y lisis alcalina de las bacterias	33
8.1.2.2. Purificación de DNA plasmídico	33
8.2. <u>Síntesis y marcado de las sondas de RNA</u>	34
9. HIBRIDACIÓN IN SITU Y MICROSCOPIA CONFOCAL	35
9.1. <u>Preparación de las muestras para hibridación in situ</u>	35
9.2. <u>Hibridación in situ</u>	35
9.3. <u>Microscopía confocal</u>	36
10. HIBRIDACIÓN IN SITU ULTRAESTRUCTURAL	37
10.1. <u>Preparación de los cortes para hibridación in situ</u>	37
10.2. <u>Hibridación in situ</u>	37
11. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE MEMBRANAS	39
12. CULTIVO IN VITRO DE POLEN AISLADO EN MEDIO LÍQUIDO	39
12.1. <u>Obtención de granos de polen y puesta en cultivo</u>	39
12.2. <u>Seguimiento de los cultivos: tinción con DAPI</u>	40
13. ANÁLISIS CUANTITATIVO	40
13.1. <u>Inmunomarcado con anticuerpos anti-histonas y anti-DNA</u>	40

---

13.2. <u>Inmunomarcado con anti-PCNA</u>	40
<b>RESULTADOS</b>	
1. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DEL CICLO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZ DE CEBOLLA	42
2. CRIOPROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	43
2.1. <u>Ultraestructura nuclear tras inclusión en Lowicryl</u>	43
3. CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES	44
3.1. <u>Método de metilación-acetilación (MA) para ácidos nucleicos</u>	44
3.2. <u>Citoquímica NAMA-Ur, específica para DNA</u>	45
3.3. <u>Tinción regresiva de EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas</u>	46
4. ESTUDIO DEL PATRÓN DE CROMATINA	46
4.1. <u>Localización ultraestructural de las histonas H2B y H4</u>	46
4.1.1. <i>Inmunomarcado sobre cortes de muestras tratadas con la citoquímica MA</i>	47
4.1.2. <i>Detección de histonas mediante inmunomarcado y tinción de los cortes con NAMA-Ur</i>	48
4.2. <u>Localización ultraestructural de DNA</u>	48
4.2.1. <i>Inmunomarcado sobre cortes de muestras tratadas con la citoquímica MA</i>	48
4.2.2. <i>Detección de DNA mediante inmunomarcado y tinción de los cortes con NAMA-Ur</i>	48
4.3. <u>Localización ultraestructural simultánea de DNA e histonas en combinación con la citoquímica MA</u>	49
5. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS LUGARES DE REPLICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CÉLULAS EN FASE S	50
5.1. <u>Inmunomarcado con oro después de incorporación in vivo de BrdU</u>	50
5.2. <u>Inmunolocalización ultraestructural de PCNA</u>	50
6. DETERMINACIÓN DE DISTINTAS FASES DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN DE PIMIENTO	51
7. CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL GRANO DE POLEN	52
8. LOCALIZACIÓN DE LOS PERIODOS DE REPLICACIÓN DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN	54
9. INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE HÍBRIDOS DNA/RNA	56
9.1. <u>Estudio de la transcripción nucleolar</u>	56
9.2. <u>Estudio de la transcripción extranucleolar</u>	57

---

10. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE FIBRAS DE DNA EN LA REGIÓN INTERCROMATÍNICA MEDIANTE LA REACCIÓN DE TdT	58
11. INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS snRNPs	58
12. INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL FACTOR UBF	59
13. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL SIMULTÁNEA DE HÍBRIDOS DNA/RNA Y EL FACTOR UBF	60
14. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA FIBRILARINA	60
15. INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE RNA	61
16. LOCALIZACIÓN DE TRANSCRITOS RIBOSÓMICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU RAN/RNA	62
16.1. <u>Hibridación in situ a nivel de microscopía confocal</u>	62
16.2. <u>Hibridación in situ a nivel de microscopía electrónica</u>	63
17. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU RNA/DNA	64
17.1. <u>Hibridación in situ a nivel de microscopía confocal</u>	64
17.2. <u>Hibridación in situ a nivel de microscopía electrónica</u>	65
18. CULTIVO IN VITRO DE POLEN AISLADO EN MEDIO LÍQUIDO	66
18.1. <u>Condiciones de los cultivos para la inducción de embriogénesis</u>	66
18.2. <u>Seguimiento de los cultivos. Tinción con DAPI</u>	66
18.3. <u>Ultraestructura de los granos de polen multinucleados</u>	67
<b>FIGURAS</b>	68
<b>DISCUSIÓN</b>	
1. VENTAJAS DE LAS CRIOTÉCNICAS	187
2. IMPORTANCIA DE LAS CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES EN LA DISTINCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS NUCLEARES EN ENSAYOS DE INMUNOMARCADO CON ORO	188
2.1. <u>Citoquímica de metilación-acetilación (MA)</u>	189
2.2. <u>Citoquímica NAMA-Ur</u>	192
2.3. <u>Ventajas de la combinación de métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos</u>	194
3. LOCALIZACIÓN DE LOS LUGARES DE REPLICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN FASE S	195
4. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL NÚCLEO	200
4.1. <u>Cromatina</u>	200
4.2. <u>Región intercromatínica</u>	203
4.2.1. Fibras de cromatina descondensada	205
4.2.2. Fibras de ribonucleoproteínas	208

4.3. <u>Nucleolo</u>	211
4.3.1. Arquitectura nucleolar	212
4.3.2. Localización de la cromatina ribosómica	213
4.3.3. Localización de los lugares de transcripción y procesamiento	217
4.3.4. Distribución de RNA en el nucleolo	220
5. CAMBIOS EN LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL NÚCLEO DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN DE <i>Capsicum annuum</i> L.	221
6. ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DEL POLEN EMBRIOGÉNICO	225
<b>CONCLUSIONES</b>	228
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	230

---

## RESUMEN

# RESUMEN

En esta memoria de tesis se presenta un estudio mediante citoquímica, inmunocitoquímica y métodos moleculares *in situ* del desarrollo gametofítico durante la formación del gametofito masculino y reprogramación a embriogénesis en una planta de interés agronómico, *Capsicum annuum* L., pimiento. En estadios inmaduros y bajo tratamientos de estrés, es posible desviar al polen de su ruta normal de desarrollo hacia una vía esporofítica, mediante la formación de embriones derivados de microsporas o granos de polen que posteriormente continúan su desarrollo dando lugar a plántulas haploides. Para estudiar este proceso de reprogramación celular hemos prestado atención al núcleo puesto que es el centro regulador de los procesos celulares y cualquier cambio de actividad génica en el programa de desarrollo se refleja en la ultraestructura nuclear. La localización de antígenos nucleares combinada con métodos citoquímicos, así como hibridación *in situ* y otros métodos moleculares *in situ* han permitido detectar DNA, RNA, snRNPs, rRNA, rDNA, híbridos DNA/RNA y proteínas nucleares y nucleolares específicas relacionadas con la maquinaria de replicación, transcripción y procesamiento que han permitido determinar los cambios dinámicos de la organización del núcleo, visualizar subcompartimentos funcionales del mismo durante los diferentes estados fisiológicos de actividad y definir subdominios estructurales y funcionales en la región intercromatínica. La puesta a punto de algunos métodos se hizo en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L, un sistema cuya organización nuclear ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo de investigación y la combinación de los métodos citoquímicos con sondas moleculares nos ha permitido asignar correctamente el marcado a los distintos compartimentos nucleares y de este modo hemos podido establecer relaciones estructura-función y seguir la activación/desactivación de los procesos nucleares en relación a las fases del ciclo celular de la microspora y el desarrollo del polen bicelular joven. Este abordaje nos ha permitido caracterizar por primera vez el estado fisiológico más adecuado, la microspora vacuolada tardía, en que tiene lugar un periodo de replicación de DNA que resultó ser el estadio de desarrollo más susceptible para responder a las señales de estrés que inducen embriogénesis.

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1. EL PIMIENTO

Los pimientos son frutos de plantas del género *Capsicum* perteneciente a la familia de las Solanáceas. El pimiento es originario de América y fue introducido en Europa en 1494, después del segundo viaje de Colón (Morrison y col., 1986). Se han establecido dos grupos principales en función de sus caracteres morfológicos (Eshbaugh y col., 1983). Estos son el grupo de flores coloreadas y el de flores blancas, en el cual se incluye *Capsicum annuum* L. Son plantas herbáceas anuales, con hojas pinnadas que parten de un eje central. Las flores están formadas por un cáliz corto y grueso y una corola de 6 pétalos. El periantio envuelve el pistilo, rodeado de 6 estambres. Su complemento genético está formado por 12 parejas de cromosomas y en ocasiones presentan dos nucleolos por célula (Fadón, 1993).

Las especies cultivadas de *Capsicum* se extienden por amplias zonas del Mundo. El principal uso del pimiento es en la industria de las especias, por ejemplo, la producción de pimentón a partir de frutos de *Capsicum annuum* L. Su importancia económica ha hecho que la mayor parte de los estudios se encaminaran hacia la mejora de los cultivos y resistencia a patógenos, si bien no hay muchos estudios en disciplinas básicas como genética y fisiología.

## 2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL PROGRAMA DE DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN

El estudio del programa de desarrollo del grano de polen se justifica por el importante papel que juega en la reproducción sexual de angiospermas como vector de transporte de los gametos masculinos (Mascarenhas, 1989; Sánchez-Pina, 1983). Existen trabajos sobre la biología celular y molecular del polen sin embargo no hay abundantes estudios del saco embrionario o gametofito femenino (Medina, 1979; Medina y Risueño, 1980). Este desequilibrio se debe a que el polen es más accesible y se produce en gran cantidad, mientras que el saco embrionario está muy protegido por los tejidos del pistilo y su abundancia es mucho menor.

El grano de polen es un sistema muy interesante para estudios del proceso de diferenciación celular y de la actividad génica diferencial de las dos células que lo forman. Las células vegetativa y generativa muestran una distinta organización nuclear que es reflejo de las diferentes funciones que desempeñan en la reproducción sexual en angiospermas. La célula vegetativa presenta una intensa actividad transcripcional encaminada a producir la maquinaria necesaria para la emisión del tubo polínico, mientras que la generativa está especializada en la formación de los núcleos espermáticos o gametos, por lo que la principal función nuclear que en ella se lleva a cabo es la replicación del DNA. La presencia de variantes exclusivas de histonas en los núcleos generativos, descrita en granos de polen de *Lolium longiflorum* L., se ha relacionado con la diferente expresión génica en las dos células del gametofito masculino (Ueda y Tanaka, 1995).

El desarrollo normal del polen es un proceso estrictamente regulado que incluye una secuencia ordenada de divisiones celulares que conducen a la formación del gametofito masculino. El desarrollo del polen es, por tanto, un sistema experimental muy atractivo para el estudio de la regulación del ciclo celular. La duración y dinámica de la fase S durante la interfase de la microspora no están muy definidas, a excepción de datos del grupo en *Scilla peruviana* L. (Arquiaga, 1985; Testillano, 1991) y tampoco se conoce con exactitud en qué periodo del ciclo está parada la célula vegetativa, aunque se ha sugerido en base a experimentos de citofotometría en núcleos de polen maduro de *Nicotiana tabacum* teñidos con Feulgen, que la célula vegetativa se encuentra en G1 (Zarsky y col, 1992). El estudio de la progresión del ciclo celular durante la gametogénesis masculina tiene gran importancia en relación al proceso de embriogénesis del polen.

### 3. DESARROLLO GAMETOFÍTICO DEL GRANO DE POLEN

En el ciclo de vida de las angiospermas se produce una alternancia entre dos generaciones, la esporofítica (diploide) y la gametofítica (haploide). La generación gametofítica se reduce a estructuras microscópicas que dependen de los tejidos del esporofito para su desarrollo. La función del gametofito es la producción de los gametos. El grano de polen es el gametofito masculino, formado en el interior de la antera. La microsporogénesis es el proceso de formación de la microspora que posteriormente dará lugar los microgametofitos, proceso que en conjunto se conoce como microgametogénesis. La masculina comienza con la división de una célula esporofítica diploide, dando lugar a las células tapetal y esporógena (célula madre del

polen) iniciales. La meiosis de las células madre del polen da lugar a tetradas de microsporas haploides, que inicialmente se mantienen unidas por una pared de calosa (1,3- $\beta$ -glucano). La pared de calosa se degrada por acción de la enzima calasa (Frankel y col., 1969), producida por el tapetum, que es el tejido más interno de la pared de la antera y que también participa en la nutrición del grano de polen durante su desarrollo y contribuye a la formación de la exina, la pared especial del polen, mediante el depósito de precursores solubles que polimerizan sobre la superficie de las microsporas (Heslop-Harrison, 1971; Risueño y col., 1969). La exina está reducida o es ausente en las aperturas, los poros a través de los cuales crece el tubo polínico. La diferenciación del tapetum se manifiesta por una masiva acumulación polar de mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi en la porción citoplásmica más próxima al lóculo de la antera. Las células del tapetum se hacen binucleadas hacia paquitene de la profase meiótica de las células madre del polen, con un contenido en DNA  $2n$  en cada núcleo (Testillano y col., 1993a). Estudios ultraestructurales demostraron que cuando las células del tapetum se diferencian en secretoras, se conectan entre sí mediante la formación de largos canales citoplásmicos (Bedinger y col., 1994). Se supone que estos canales sirven para sincronizar la diferenciación del tapetum y su función durante el desarrollo del polen.

Las microsporas, después de su liberación de la tetrada al lóculo de la antera por disolución de la pared de calosa, experimentan un aumento de volumen, acompañado de un proceso de vacuolación que culmina hacia el final de la larga interfase postmeiótica con la formación de una gran vacuola que ocupa la mayor parte del volumen del citoplasma y empuja lateralmente el núcleo, creando una polaridad celular que condiciona el desarrollo posterior de la microspora (Arquiaga, 1985; Fadón, 1993; Testillano, 1991). La microspora está programada para dividirse asimétricamente dando lugar a dos células con destinos diferentes. El proceso de vacuolación que tiene lugar durante la interfase de la microspora crea las condiciones para que la división asimétrica tenga lugar, posiblemente mediante el establecimiento de gradientes de determinados factores citoplásmicos, obligando la orientación del huso mitótico paralela al tonoplasto de la vacuola, ya que el plano de división no la puede atravesar. Cuando la división de la microspora está próxima, las células del tapetum degeneran y mueren, de forma posiblemente programada (Bedinger y col., 1994).

Tras la división mitótica se forma el grano de polen con dos células diferentes, la vegetativa y la generativa, confinadas en la pared original de la microspora. La célula vegetativa ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen, mientras que la generativa es más pequeña y está incluida en el citoplasma de la anterior. El citoplasma vegetativo es rico en todo tipo de orgánulos que van aumentando en número durante la maduración del grano de polen, al tiempo que se reabsorbe la vacuola que ocupaba gran parte de ese citoplasma (Giménez-Martín, 1970; Sanger y Jackson, 1971). Aparecen entonces gran número de plastidios que se van llenando de almidón (Feijoo y Pais, 1988; Rodríguez-García y García, 1978) y otras estructuras de reserva como gotas de lípidos, partículas P con polisacáridos (Heslop-Harrison, 1979). La célula generativa, en cambio, presenta una fina capa de citoplasma con pocas mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico disperso y dictiosomas (Burgess, 1970; Sanger y Jackson, 1971). Sin embargo no aparecen plastidios en esta célula posiblemente debido a la distribución polar de los orgánulos previa a la mitosis (Reynolds, 1990). Se ha descrito una baja densidad de poros nucleares, reflejo de la escasa actividad transcripcional de la célula generativa (Wagner y col., 1990), aunque tiene lugar la expresión de genes cuyos productos se requieren para la segunda mitosis del polen, tales como ciclinas u otras proteínas de control del ciclo celular (Jacobs, 1992). La célula generativa posee una pared celular propia en la que se ha detectado la presencia de calosa (Gorska-Brylass, 1967). En etapas sucesivas del proceso de maduración del polen, la célula generativa migra desde su posición inicial periférica, en contacto con la pared del polen, hacia el interior del grano de polen. Este proceso está acompañado de un cambio en la forma de la célula generativa que en la fase de madurez adopta un perfil fusiforme (Giménez-Martín, 1970).

Las células vegetativa y generativa no sólo son morfológicamente distintas, si no que tienen un diferente programa de desarrollo. La célula vegetativa es la encargada de la síntesis de la maquinaria necesaria para la formación de tubo polínico, que lleva los gametos masculinos a través del estilo hasta el saco embrionario o gametofito femenino para la doble fecundación. En cambio la célula generativa, entra en ciclo celular y se divide mitóticamente dando lugar a dos núcleos espermáticos o gametos masculinos. Numerosos estudios han mostrado una estrecha asociación entre las células vegetativa y generativa. Se ha demostrado que existe una mayor densidad de poros nucleares en la superficie del núcleo vegetativo próxima a la célula generativa que en la superficie contraria (Shi y col., 1991). Sin embargo no hay experimentos que identifiquen qué transcritos o proteínas

específicas son transportados desde la célula vegetativa a la generativa (McCormick, 1993).

En la mayoría de las familias el grano de polen maduro es bicelular y las células espermáticas se originan durante la emisión del tubo polínico. Este es el caso del grano de polen de *Capsicum annuum* L. (Fadón, 1993). En otras especies, la segunda mitosis del polen ocurre en la antera dando lugar al grano de polen tricelular. En las etapas finales de la maduración ocurre una drástica deshidratación que reduce el contenido de agua desde un 90% hasta un 45-50% en el momento de la antesis o dehiscencia de la antera (Barnabas, 1985). Una vez producida la antesis, el grano de polen es transportado por el viento, insectos u otros agentes al estigma de un pistilo adecuado. Entonces tiene lugar la germinación y el grano de polen emite el tubo polínico que crece por el interior del estilo transportando los núcleos espermáticos (Arquiaga, 1985). Uno de ellos se fusiona con la célula huevo o gameto femenino dando lugar al cigoto diploide, y el otro se funde con la célula central del saco embrionario originando el endospermo triploide, responsable de la nutrición del embrión.

Estudios moleculares han demostrado que la transcripción del genoma haploide tiene lugar durante el desarrollo del gametofito masculino (Mascarenhas, 1989). Algunos genes expresados en el polen son específicos de la generación gametofítica, mientras que otros también se expresan en el esporofito. Asimismo se ha observado una elevada tasa de síntesis de RNA ribosómico durante la interfase de la microspora, que decae a medida que el grano de polen madura (Mascarenhas y Bell, 1970; Peddada y Mascarenhas, 1975; Steffensen, 1966). Estudios ultraestructurales de la evolución de la arquitectura nucleolar durante la interfase de la microspora demostraron una progresiva activación de la biosíntesis de ribosomas, que alcanza su actividad máxima en G2 (Risueño y col., 1988; Testillano, 1991). La biosíntesis de ribosomas durante estas fases se requiere para la traducción de los RNAs mensajeros sintetizados en los diferentes estadios del programa gametofítico. Se ha descrito la existencia de dos momentos durante el desarrollo del polen en los que tiene lugar una diferente actividad génica (Stinson y col., 1987). Un primer grupo de genes se expresaría después de finalizada la meiosis y su actividad se reduciría a medida que el polen madura. Estos genes también son activos en tejidos esporofíticos. El otro grupo se activaría después de la mitosis de la microspora y el patrón de acumulación de RNAs mensajeros en los estadios finales de la maduración, sugeriría su participación en los procesos de germinación y emisión del

tubo polínico (Mascarenhas, 1989). Recientemente se ha determinado que la expresión de *heat shock proteins* (HSP) de bajo peso molecular tiene lugar en las etapas finales de la maduración del polen, durante la deshidratación previa a la antesis (Zarsky y col., 1995). Aunque su función biológica es desconocida, se especula con que podrían estar implicadas en la protección de estructuras celulares durante la deshidratación.

El programa de desarrollo del grano de polen puede ser reproducido *in vitro* bajo ciertas condiciones de cultivo. Este proceso se conoce como maduración *in vitro* y da lugar a granos de polen viables (Benito-Moreno y col., 1988).

#### 4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE MICROSPORAS Y POLEN INMADURO

El desarrollo de la técnicas de cultivo *in vitro* de microsporas y granos de polen inmaduros ha abierto grandes posibilidades para su aplicación en programas de biotecnología. En condiciones que suplen la acción del tapetum, el tejido que tapiza internamente el saco polínico y que participa en la nutrición del polen durante las primeras fases de su desarrollo, las microsporas o granos de polen inmaduros se desarrollan *in vitro* produciendo polen maduro que es capaz de germinar y es por tanto viable para la fecundación (Benito-Moreno y col., 1988). Este método fue desarrollado en tabaco y se basa en la utilización de medios de cultivo ricos en glutamina (Benito-Moreno y col., 1988). La disponibilidad del sistema de maduración de polen permite evitar los casos de autoincompatibilidad polen-estigma (Heberle-Bors, 1989). Muchas plantas han desarrollado mecanismos para controlar selectivamente el éxito reproductivo del polen (Heberle-Bors, 1989; Vicente y col., 1991). Las proteínas localizadas en la pared del polen reconocen otras en el estigma o estilo previniendo la germinación cuando las dos proteínas están codificadas por el mismo locus, o permitiendo el crecimiento del tubo polínico cuando ambas proteínas están codificadas por loci diferentes (Herrero y Dickinson, 1979). Cuando las microsporas o polen inmaduro se aíslan de las anteras y se cultivan en medio de maduración es posible prevenir el depósito de esas proteínas (autoincompatibilidad esporofítica) o permitir que se liberen al medio (autoincompatibilidad gametofítica). En ambos casos, las proteínas podrían estar ausentes de la pared del polen y la autopolinización sería posible. La posibilidad de superar las barreras de autoincompatibilidad puede ser explotada en mejora vegetal al permitir la producción de líneas endogámicas.

Otra aplicación del método de maduración *in vitro* es la de rescatar polen en casos de esterilidad masculina (Heberle-Bors, 1989; Vicente y col., 1991). Muchos tipos de esterilidad masculina (nuclear o citoplásmica) se deben a una disfunción del tapetum que conduce al aborto del polen y con frecuencia se producen microsporas cuyo desarrollo post-meiótico está bloqueado. La identificación de mutantes de esterilidad masculina con evidentes defectos en la estructura de las células tapetales, apoya fuertemente el importante papel del tapetum en el desarrollo del polen (Bedinger y col., 1994). En esos casos, el aislamiento de las microsporas antes del aborto y su maduración *in vitro* permitiría rescatar el polen inviable.

Otra aplicación interesante de la maduración *in vitro* es la posibilidad de llevar a cabo la selección de polen. Aproximadamente un 60% de los genes expresados en el esporofito también se expresan en el polen (Mascarenhas y col., 1985; Tanksley y col., 1981; Willing y Mascarenhas, 1984). Dado el número elevado de granos de polen por flor y su dotación génica haploide, este solapamiento genético permite la selección de muchos caracteres esporofíticos (por ejemplo de resistencia) a nivel de polen mediante la aplicación de presión de selección durante la maduración *in vitro* seguida de polinización *in situ* con los granos de polen que contienen los genes de interés (Heberle-Bors, 1989; Mulcahy y Mulcahy, 1983).

La transformación del polen ha sido propuesta como un método muy conveniente para la transferencia de genes en plantas superiores (Hess, 1980; 1987; Ohta, 1986). Después de muchos años de trabajo no hay una clara evidencia de que el polen maduro pueda incorporar DNA y transferirlo al saco embrionario (Heberle-Bors y col., 1990). La aplicación del método de bombardeo de partículas ha permitido transferir DNA en polen maduro (Twell y col., 1989). Este DNA se expresa transitoriamente durante el crecimiento del tubo polínico pero no se transmite a la descendencia. La transformación de microsporas y su posterior maduración *in vitro* resulta ser más adecuada incluso que en meiocitos (De la Peña y col., 1987) y de esta forma se asegura que el DNA se incorpore al genoma de la célula generativa y de este modo se transmita a la siguiente generación (Alwen y col., 1990; Stöger y col., 1992).

## 5. CULTIVO IN VITRO DE MICROSPORAS Y GRANOS DE POLEN PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES HAPLOIDES

Los antecedentes de la producción de plantas haploides a partir de polen se remontan a los experimentos de Guha y Maheshwari (1964) en *Datura innoxia*. Utilizando la técnica de cultivo in vitro de anteras en medio sólido para estudiar el desarrollo del polen, estos autores observaron la aparición sobre la superficie de las anteras de embriones y posteriormente plantas, de número cromosómico haploide y por lo tanto originadas del polen (Guha y Maheshwari, 1966). A partir de este momento se obtuvieron plantas haploides derivadas de polen en varias especies (Maheshwari y col., 1982; Raghavan, 1986). Los haploides permiten la eliminación de mutaciones letales y la detección inmediata de mutaciones recesivas, deletéreas o no, que quedan desenmascaradas al no existir el homólogo dominante. La obtención de líneas isogénicas por duplicación cromosómica del haploide es el único sistema para obtener líneas totalmente homocigóticas y permite abordar otras estrategias como la selección in vitro de poblaciones de interés económico como la tolerancia a situaciones de estrés, patógenos, etc... Debido a la importancia de la obtención de plantas haploides para mejora vegetal, se ha invertido un gran esfuerzo para producir plantas a partir de polen en varias especies (Heberle-Bors, 1985; 1989; Morrison y Evans, 1988). El cambio de programa de desarrollo del polen desde la vía gametofítica a la esporofítica ha abierto interrogantes sobre los mecanismos que lo desencadenan y en los últimos años los estudios se han dirigido hacia la caracterización de los cambios estructurales y de los procesos bioquímicos que se activan y/o reprimen cuando el polen es inducido hacia embriogénesis (Fadón, 1993; Garrido y col., 1995; González-Melendi y col., 1995; Hause y col., 1993; Hause y col., 1995; Pretova y col., 1993; Telmer y col., 1993; Touraev y col., 1995; Zaki y Dickinson, 1990; 1991; Zarsky y col., 1992).

Aunque el cultivo in vitro de anteras ha resultado ser eficiente para la producción de plantas haploides, sin embargo la pared de la antera representa una barrera no solo para la observación microscópica directa de la evolución del polen en desarrollo en los cultivos, si no también para la transferencia de componentes desde el medio de cultivo hasta las microsporas o polen en desarrollo. Además la pared de la antera puede añadir al sistema sustancias no bien caracterizadas que dificultan el control de la inducción y desarrollo del polen embriogénico y no se tiene la completa seguridad de que los embriones obtenidos por cultivo de anteras deriven del polen y no de células somáticas (diploides). Para superar estos problemas se han establecido

sistemas de cultivo in vitro de microsporas y polen aislados (Chuong y Beversdorf, 1985; Benito-Moreno y col., 1988; Heberle-Bors, 1989; Kott y col., 1988; Kyo y Harada, 1986; Lichter, 1982; Telmer y col., 1993; Zaki y Dickinson, 1990). La técnica de cultivo de anteras es más adecuada para los mejoradores que buscan la producción de líneas isogénicas, mientras que el cultivo de polen aislado es la técnica idónea para los investigadores que estudian los factores que controlan el proceso de la embriogénesis del polen. El éxito de los cultivos de polen depende de la calidad de las plantas donadoras. Las plantas ahorran recursos en situaciones de crecimiento desfavorables mediante la producción de polen no funcional, puesto que durante el desarrollo del grano de polen se produce una acumulación de almidón, proteínas y otras sustancias de reserva, lo cual consume mucha energía.

*Brassica napus* y *Nicotiana tabacum* son las plantas modelo en las que se han puesto a punto las condiciones para la obtención de embriones haploides a partir de cultivos in vitro de polen aislado bajo situaciones de estrés. En *Brassica*, las microsporas aisladas justo antes de la mitosis son inducidas a formar embriones por un choque térmico de 32°C (Custers y col., 1994; Hause y col., 1993; Lichter, 1982; Pecham y Keller, 1988) seguido de cultivo a 25°C. Un tratamiento a 32°C de una duración de 8 horas fue suficiente para reprogramar irreversiblemente las microsporas hacia embriogénesis. Durante este periodo de tiempo se produce una reorganización del citoesqueleto que cambia la orientación del huso mitótico influyendo en la división simétrica (Hause y col., 1993; Zaki y Dickinson, 1991).

En tabaco, el estadio de desarrollo más eficiente para la inducción de embriogénesis es el polen bicelular medio. En esta fase la célula generativa ya se ha separado de la pared, se observan nucleolos distintos en las células vegetativa y generativa, la vacuola de la microspora se ha reabsorbido, y comienza a depositarse almidón en el citoplasma vegetativo. La señal que desencadena la respuesta embriogénica en el polen bicelular medio de tabaco es un cultivo en medio de ayuno. Kyo y Harada (1986) realizaron cultivos en un medio osmóticamente equilibrado sin azúcares ni nitrógeno (medio B) durante 3-4 días. Al transferir los granos de polen a un medio de cultivo rico en azúcares, obtuvieron estructuras multicelulares que se parecían a embriones globulares. El grupo de Heberle-Bors en Viena, desarrolló un sistema de inducción de embriogénesis consistente en cultivo en un medio de ayuno sin azúcares, pero con nitrógeno (medio AM4) durante 6-7 días, seguido de un cultivo en un medio rico en sacarosa y suplementado con Fe-EDTA, en el cual se observó una alta respuesta embriogénica, con la aparición de embriones globulares y

posteriormente acorazonados y torpedo, los cuales, en un medio con una baja concentración de sacarosa, dieron lugar a plántulas (Benito-Moreno y col., 1988; Garrido y col., 1991). El polen obtenido al final del periodo de ayuno presenta unas características citológicas que permiten distinguirlo de cualquier estadio del desarrollo normal del grano de polen (Heberle-Bors, 1989). Los núcleos (vegetativo y generativo) se sitúan en el centro del grano de polen. El citoplasma es escaso, reducido a una fina capa en contacto con la pared con conexiones hacia el interior, a través de vacuolas. No se observa la presencia de almidón. Estas características citológicas, apreciables en aplastados teñidos con acetocarmin, son debidas a un proceso de degradación citoplásmica como consecuencia del cultivo en medio de ayuno (Heberle-Bors, 1989). Estudios ultraestructurales han demostrado la regresión citoplásmica en el polen embriogénico de tabaco, con la formación de vacuolas y la desaparición de almidón (Garrido y col., 1995). Esta degradación citoplásmica, posiblemente está relacionada con la inhibición y eliminación de los productos de la expresión génica del gametofito (Garrido y col., 1993). Además estos autores han detectado una intensa condensación cromatínica y una estructura nucleolar típica de una baja actividad sintética (Garrido y col., 1995). Los cambios ultraestructurales observados en el polen en cultivo de tabaco reflejan un bloqueo de la actividad celular en respuesta al tratamiento de estrés, similar al producido experimentalmente tras tratamientos físicos y químicos (Risueño y Medina, 1986).

En pimiento, estudios anteriores de Sibi y col. (1979) habían descrito la inducción de embriogénesis a partir de cultivos de anteras que contenían microsporas próximas a la mitosis. Los botones florales se pretrataban a 4°C durante 48 horas y después las anteras se cultivaban en un medio base enriquecido con hormonas y vitaminas. Como resultado de la división de las microsporas en esas condiciones, se obtuvieron dos células simétricas cuya evolución posterior era comparable a la de la embriogénesis zigótica. El pretratamiento a 4°C de los botones florales, podría actuar de forma equivalente al cultivo en medio de ayuno, al ralentizar el metabolismo y por tanto el aporte de nutrientes desde el tapetum a las microsporas (Vicente, comunicación personal).

La disponibilidad de dos eficientes sistemas de cultivo in vitro de microsporas y polen para embriogénesis ha abierto la posibilidad de aplicar técnicas bioquímicas y moleculares para estudiar los mecanismos implicados en el cambio de programa de desarrollo hacia la vía esporofítica. En geles bidimensionales teñidos con plata de extractos de microsporas de *Brassica* después de 8 horas de tratamiento a 32°C (es

decir, inducidas hacia embriogénesis) se observan varios puntos correspondientes a proteínas específicas que están ausentes o presentes en bajos niveles en microsporas no inducidas, cultivadas a 25°C. Asimismo se ha observado que algunos RNAs mensajeros se activan por el tratamiento de choque térmico (Pecham y col., 1991). En tabaco, se ha descrito que la transcripción de genes específicos tiene lugar durante el tratamiento de ayuno y al menos dos RNAs mensajeros mayoritarios se inducen en respuesta al tratamiento de ayuno (Garrido y col., 1993). Sin embargo las proteínas correspondientes no han sido detectadas en polen embriogénico después de marcado *in vivo* con metionina [ $S^{35}$ ]. Kyo y Harada (1990) tampoco detectaron la síntesis de ninguna proteína específica de polen embriogénico en geles bidimensionales teñidos con plata. Estos resultados sugieren que los RNAs mensajeros sintetizados en el polen embriogénico son almacenados en una forma transcripcionalmente inactiva y sólo se traducen cuando son transferidos a un medio rico en azúcar. Puesto que la síntesis de proteínas es un proceso que requiere un alto consumo energético, el polen embriogénico puede disponer de mecanismos que eviten la traducción de estos mensajeros puesto que sus productos no son necesarios para la supervivencia inmediata bajo condiciones de ayuno (Garrido y col., 1993). Sin embargo, no ha sido probado que la inducción de la expresión génica en cultivos de microsporas de *Brassica* bajo condiciones de choque térmico o de granos de polen de tabaco cultivados en medio de ayuno, esté relacionada con la inducción de embriogénesis. Posiblemente se trate de la expresión de genes relacionados con una respuesta a tratamientos de estrés (Garrido y col., 1993; Vicente y col., 1991).

## 6. EL NÚCLEO CELULAR

El núcleo es el centro regulador que gobierna los procesos celulares y su organización funcional refleja el estado de actividad de la célula (Fakan y Puvion, 1980; Risueño y Medina, 1986; Risueño y Testillano, 1994). Los estudios ultraestructurales del núcleo celular han definido distintos compartimentos nucleares, no separados por un sistema de membranas, en los que se llevan a cabo diferentes funciones. El patrón de condensación de la cromatina, densidad de estructuras fibrilares y granulares en la región intercromatinica y arquitectura nucleolar, cambian durante el desarrollo gametofítico en relación a las variaciones de la actividad génica (Risueño y col., 1988; Testillano y Risueño, 1988; Testillano y col., 1995). El programa de desarrollo del polen es por tanto un proceso muy interesante para estudiar la organización funcional del núcleo y el establecimiento de relaciones

estructura-función en base a la localización de moléculas asociadas a distintos procesos nucleares en diferentes momentos de actividad.

La reprogramación del polen hacia embriogénesis en respuesta a tratamientos de estrés supone cambios que pueden ser detectados estudiando las variaciones en la organización e interrelación entre los compartimentos nucleares. Apenas existen datos moleculares (Garrido y col., 1993; Kyo y Harada, 1990; Zarsky y col., 1992, 1995) sobre el proceso de la inducción de embriogénesis del polen, pero son aún menos numerosos los estudios celulares. Hemos comenzado por realizar un estudio secuencial a nivel celular de la organización nuclear durante el desarrollo gametofítico, *especialmente en los estadios más sensibles para responder a las señales de estrés que desencadenan el proceso embriogénico*. La caracterización del estado de actividad en esas fases y en el polen embriogénico permitirá determinar marcadores celulares del proceso de inducción de embriogénesis del polen y por tanto obtener información sobre los procesos que se activan cuando el polen es reprogramado hacia la vía esporofítica. Este estudio se ha abordado mediante la aplicación de métodos citoquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación in situ para la *detección in situ de moléculas y procesos*.

## OBJETIVOS

# OBJETIVOS

Después de que Guha y Maheshwari obtuvieran en 1964 embriones haploides de *Datura* a partir de anteras en cultivo, se abrió una nueva línea de investigación encaminada a inducir embriogénesis de polen en otras especies de interés científico y comercial. Sin embargo aún no se conocen cuales son los mecanismos que disparan la respuesta embriogénica. Nuestro interés se centraba en la caracterización celular, mediante métodos de localización in situ de moléculas, del proceso de inducción de embriogénesis. Para ello fue necesario realizar en primer lugar un estudio secuencial del desarrollo gametofítico, especialmente de aquellas fases más susceptibles de responder a las condiciones de estrés que inducen embriogénesis, cuya comparación con las características del polen embriogénico proporcionaría una información muy útil para comprender cómo el polen se reprograma hacia una ruta de desarrollo esporofítica. Hemos preseguido los siguientes objetivos:

1.- Se adaptarán a las condiciones de nuestro material los métodos de crioprocesamiento de muestras mediante inclusión en resinas que polimerizan a baja temperatura, para preservar la ultraestructura celular próxima al estado in vivo, a la vez que el mantenimiento de las propiedades químicas y antigénicas, con objeto de localizar moléculas asociadas a distintos procesos nucleares que permitieran definir estados fisiológicos en distintos momentos del desarrollo del polen y fases del ciclo celular.

2.- Seguimiento de la organización funcional del núcleo durante el desarrollo gametofítico y establecimiento de relaciones estructura-función. Determinación de los cambios en el patrón de condensación de la cromatina, región intercromatínica y nucleolo.

2.1.- Estudio de los cambios ultraestructurales mediante la aplicación de técnicas citoquímicas específicas o preferenciales: tratamiento de metilación-acetilación, preferencial para ácidos nucleicos, NAMA-Ur, específica para DNA y tinción de EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas.

2.2.- Inmunolocalización de moléculas que participan en importantes funciones nucleares, asociadas a procesos de replicación, transcripción y procesamiento.

2.3.- Localización de los genes ribosómicos y los productos de la transcripción mediante hibridación in situ en relación a la subcompartimentalización estructural del nucleolo. Estudio de la organización funcional de la cromatina ribosómica en el nucleolo y la distribución del RNA ribosómico.

3.- Determinación de las condiciones de estrés más adecuadas para inducir una respuesta embriogénica así como de los marcadores más adecuados para seguir la evolución de los cultivos. Estudio de las características ultraestructurales del polen embriogénico.

4.- Caracterización mediante métodos in situ de localización de moléculas, del estado fisiológico más susceptible a la respuesta embriogénica con objeto de conocer los mecanismos que intervienen en la reprogramación hacia la ruta esporofítica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# MATERIALES

El material utilizado en esta Tesis fue polen de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en diferentes momentos del desarrollo gametofítico y en los primeros estadios del desarrollo esporofítico inducido mediante tratamientos de estrés que hacen que el polen se re programe hacia embriogénesis. Para la puesta a punto de las técnicas empleadas en esta memoria de tesis y la búsqueda de marcadores de ciclo celular se utilizaron meristemas de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.) puesto que se trata de un material cuyo ciclo celular está bien caracterizado (De la Torre y col., 1989) y cuya organización nuclear ha sido objeto de estudio en nuestro grupo durante años (Risueño y Medina, 1986; Risueño y Testillano, 1994).

## 1. GRANOS DE POLEN DE PIMIENTO

Para la obtención de las plantas de pimiento se geminaron semillas de la variedad americana, mantenidas a 4°C, en una mezcla de turba y sustratos. El semillero se cubrió con plástico para mantener la humedad hasta la aparición de plántulas que, entonces, se transplantaron a macetas. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en una cámara de crecimiento de plantas con una intensidad de luz de 14000 luxes y una distancia de las bandejas a la fuente de luz de 60 cms., una temperatura de 23 °C y una humedad del 80%. Para el riego se utilizó una solución de un fertilizante rico en hierro, para evitar la clorosis de la hojas. *Capsicum annuum* es una planta de día largo, por lo que para la floración requiere un fotoperiodo de 14 horas.

Transcurridos de 2 a 3 meses desde la siembra de las semillas, las plantas empezaron a florecer. Se seleccionaron anteras de diferente tamaño que contenían granos de polen en diferentes momentos del desarrollo gametofítico. Para el cultivo in vitro de polen aislado, se escogieron botones florales en los que la longitud de los pétalos era ligeramente superior a la de los sépalos.

## 2. MERISTEMOS DE RAÍZ DE CEBOLLA

Se utilizaron bulbos de la variedad francesa, obtenidos en el mercado. Para su germinación, se eliminaron las primeras capas secas y se lavaron con abundante

agua para eliminar los inhibidores de la germinación que suelen traer los bulbos comerciales. A continuación se colocaron en tubos largos y estrechos llenos de agua filtrada en la que se sumergía la corona radicular. Al cabo de unos dos días a temperatura ambiente se obtenían raíces de 3-4 cm de longitud. Se cortaron con un bisturí los 3-4 mm apicales, que contienen el meristemo, y se fijaron.

# MÉTODOS

## 1. INCORPORACIÓN *IN VIVO* DE BrdU

Las raíces de cebolla, dos días después de su germinación, se trataron con una solución acuosa de 5-bromo-2'deoxiuridina 0.1 mM, 5-fluorodeoxiuridina 0.1  $\mu$ M y uridina 5  $\mu$ M durante 1 hora (De la Torre y González, 1979; De la Torre y col., 1985). Transcurrido este tiempo, los ápices radiculares se cortaron, se fijaron como se indica en el apartado 3.1., se deshidrataron (ver apartado 3.2.), se trataron con el método de metilación-acetilación (MA, ver apartado 5.1.) y se incluyeron en Lowicryl K4M (ver apartados 3.3. y 3.4.). Algunas muestras se incluyeron directamente en Lowicryl sin realizar previamente el tratamiento de metilación-acetilación.

## 2. PROCESAMIENTO CONVENCIONAL DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se tomaron muestras de granos de polen en cultivo *in vitro* a distintos tiempos y se procesaron para estudios de microscopía electrónica con objeto de determinar los cambios ultraestructurales que se producen cuando el polen es desviado de su programa de desarrollo normal hacia embriogénesis, en relación a las características ultraestructurales que muestran los granos de polen durante su desarrollo gametofítico.

### 2.1. Fijación

#### 2.1.1. Fijador Karnovsky

Como fijador primario se utilizó la solución de Karnovsky que se compone de una mezcla de los fijadores formaldehído y glutaraldehído en tampón cacodilato 0.025 M, pH 6.9. Las concentraciones finales de ambos fijadores fueron 4% y 5%, respectivamente.

Primero se preparó un solución de formaldehído 8% (p/v) (preparada a partir de paraformaldehído en polvo, Schuchardt München) en agua. Para la completa disolución del paraformaldehído, es necesario calentar la solución en baño hasta que

ésta se vuelva completamente transparente. Si esto no fuera suficiente, se añade una gota de NaOH 1N. Inmediatamente la solución se enfría en hielo. Los vapores de formaldehído son tóxicos por lo que el recipiente en que se prepara la solución debe estar bien cerrado y la fijación ha de realizarse en campana, sobre hielo.

A continuación se añaden las cantidades apropiadas de glutaraldehído 25% (TAAB) y cacodilato 0.1 M (solución concentrada preparada a partir del polvo comercial, TAAB) para obtener las concentraciones finales deseadas. Además se añaden 0.5 µg/ml de CaCl<sub>2</sub> anhidro y el pH se ajusta a 6.9.

Para facilitar la penetración de los fijadores las muestras se desgasificaron durante 1 min. en una bomba de vacío. La fijación se llevó a cabo durante 5 horas a temperatura ambiente. Después el fijador se eliminó mediante dos lavados en cacodilato 0.025 M de 30 min. cada uno, a temperatura ambiente. Para hacer los cambios la suspensión de granos de polen se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en tampón. Después del último cambio los granos de polen se incluyeron en agar noble 5% en cacodilato 0.025 M. La solución de agar se mantuvo en un baño a 40°C para evitar su solidificación y se añadieron entre 50 y 100 µl en función de la cantidad del precipitado de polen. Inmediatamente después de resuspender el polen en la solución de agar, se centrifugó y se dejó solidificar en hielo. A los pocos minutos se extrajo la inclusión de agar y bajo una lupa se descartó la zona superior que no contenía granos de polen, mientras que la inferior, en la que se concentraban éstos, se cortó en pequeños cubos de aproximadamente 4 mm<sup>3</sup>. Las muestras se mantuvieron en cacodilato 0.025 M durante una noche a 4°C.

### **2.1.2. Tetróxido de osmio**

Como fijador secundario se utilizó tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato 0.025 M. Se prepara a partir de ampollas con 0.1 gr. de tetróxido de osmio cristalizado (Serva). La ampolla de vidrio se calienta en un baño de agua hirviendo para quitarle la etiqueta, con lo cual se licúa su contenido. Después se enfría con agua al chorro para que solidifique. El centro de la ampolla se raya con un lápiz de diamante para facilitar su rotura y se introduce en un frasco de vidrio de paredes gruesas, lleno con mezcla sulfocrómica para limpiar el recipiente y la ampolla. Se mantiene así durante una hora y después se lava en agua corriente durante dos horas. Finalmente se elimina todo el agua y se rompe la ampolla dentro del frasco con un golpe de mazo. Inmediatamente se añaden 5 ml de agua destilada, con lo que

se consigue un solución de tetróxido de osmio 2% que se almacena a 4°C, bien tapada para evitar la salida de los vapores tóxicos de osmio. Para su utilización se diluye a la mitad en cacodilato 0.05 M.

La postfijación se realiza en una solución de tetróxido de osmio 1% en cacodilato 0.025 M durante dos horas, al cabo de las cuales las muestras adquieren un color negro signo de la fijación del osmio. Después de tres lavados en cacodilato 0.025 M de 30 min. cada uno, las muestras se deshidratan.

## **2.2. Deshidratación**

La deshidratación se lleva a cabo en viales donde el material se trata de la siguiente manera: etanol 30%, 60 min.; etanol 50%, 60 min.; etanol 70%, una noche a 4°C; etanol 90%, 60 min.; etanol 100%, 60 min., tres veces; etanol 100%:óxido de propileno (1:1, v:v), 5 min.; óxido de propileno, 10 min., tres veces.

## **2.3. Infiltración**

Las muestras deshidratadas se infiltraron en la resina Epon 812 (Serva) de naturaleza hidrofóbica y muy útil para estudios ultraestructurales. Los recipientes que se utilizan para su preparación tienen que estar bien secos ya que la humedad dificulta la polimerización.

Se parte de cuatro componentes comerciales: Epon 812, DDSA, MNA y DPM-20, conservados a 4°C, con los que se preparan las siguientes mezclas:

Mezcla A: 31 ml de Epon 812 y 50 ml de DDSA

Mezcla B: 50 ml de Epon 812 y 44.5 ml de MNA

Las mezclas se homogenizan mediante agitación lenta durante 20 min. para evitar la formación de burbujas de aire. La mezcla final contiene 75 ml de mezcla A, 75 ml de mezcla B y 2.7 ml de DMP-20. Finalmente se agita durante 20 min. y se almacena en jeringas de plástico a -20°C.

La preparación y manipulación de la resina debe hacerse con guantes ya que puede producir alergias por contacto con la piel.

Las jeringas de Epon que se vayan a utilizar para la infiltración y polimerización, se sacan del congelador minutos antes de su uso para que la resina recupere su consistencia líquida. Las muestras se sumergen en una mezcla de óxido de propileno:Epon (1:1, v:v) durante 45 min. a temperatura ambiente. Después se pasan a otro vial con Epon puro en el cual se mantienen otros 45 min. El proceso de infiltración se completa durante una noche a 4°C en rotación. Transcurrido este tiempo las muestras deberán estar completamente sumergidas en la resina.

#### **2.4. Polimerización**

Los viales se sacan a temperatura ambiente unos minutos y se pasan destapados a una estufa a 37°C durante dos horas con objeto de eliminar la humedad que hayan podido tomar.

Finalmente cada muestra se deposita individualmente en el fondo de cápsulas de gelatina dispuestas en una gradilla sobre un transiluminador, orientándola adecuadamente. Las cápsulas se rellenan completamente con la resina y se introducen en una estufa a 70°C durante al menos 18 horas para conseguir la completa polimerización.

### **3. CRIOPROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

#### **3.1. Fijación**

Se utilizaron ápices meristemáticos de raíz de cebolla (con y sin incorporación de BrdU) y anteras de pimiento. La fijación se realizó en una solución de formaldehído al 4% (p/v) (preparada a partir de paraformaldehído en polvo, Schuchardt München) en tampón fosfato salino [PBS: NaCl 140 mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.3], durante una noche a 4°C (ver descripción detallada sobre su preparación en apartado 2.1.1.).

Para facilitar la penetración del fijador, las muestras se desgasificaron durante 1 min. en una bomba de vacío. Después de la fijación, las muestras se lavaron en PBS tres veces, durante 15 min. cada una, a 4°C. En el caso de que las muestras no se pudieran procesar inmediatamente después de la fijación, se pueden almacenar en una solución de formaldehído al 0.1% en PBS a 4°C, para evitar la reversión de la reacción.

### 3.2. Deshidratación

La deshidratación se realizó a 4°C en una serie de metanol de concentración creciente. Las concentraciones y tiempos utilizados fueron: metanol 30%, 10 min.; metanol 50%, 10 min.; metanol 70%, 10 min.; y finalmente metanol 100%, 1h.

### 3.3. Infiltración

Las muestras deshidratadas se infiltraron en la resina Lowicryl K4M (TAAB). Esta resina se prepara a partir de tres componentes que se mezclaron en la siguiente proporción: 2.7 grs. de crosslinker, 17.3 grs. de monomer y 0.1 grs. de benzoin etiléter. Esta mezcla se prepara en campana, con protección de guantes y mascarilla, ya que los vapores de Lowicryl son muy tóxicos y el contacto con la piel puede producir alergias.

La infiltración se realizó en agitación y a 4°C en mezclas de metanol y Lowicryl, con concentraciones crecientes de resina: metanol:Lowicryl 1:1 (v:v) 2 h., metanol:Lowicryl 1:2 (v:v) 2 h. y Lowicryl puro dos noches, con un cambio de resina transcurridos los primeros 60 min.

### 3.4. Inclusión y polimerización

Para la inclusión se utilizaron cápsulas de gelatina dispuestas en una gradilla sobre hielo. Las muestras se depositaron en el fondo adecuadamente orientadas y las cápsulas se rellenaron completamente con resina recientemente preparada y se taparon, ya que la presencia de oxígeno dificulta la polimerización.

La gradilla con las cápsulas se trasladó a una cámara de polimerización provista de una lámpara ultravioleta superior, que consta de dos tubos TL6W/0.5 (Philips), situada a una distancia de las muestras de 25 cms, y recubierta interiormente con paneles metálicos para asegurar una radiación difusa y reflejada. La polimerización se completó al cabo de 24 h. de irradiación ultravioleta a 4°C y otras 24 h. a temperatura ambiente.

## 4. OBTENCIÓN DE CORTES SEMIFINOS Y ULTRAFINOS

### 4.1. Cortes semifinos

Debido a la heterogeneidad del material utilizado, fue necesario obtener cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  con objeto de seleccionar las células de interés, a saber: células meristemáticas, en el caso de los ápices de raíz de cebolla, granos de polen en diferentes momentos de su desarrollo gametofítico, en el caso de las anteras de pimiento y granos de polen en cultivo *in vitro*. Asimismo, estos cortes observados bajo contraste de fases en un microscopio óptico sirvieron de control de la fijación. Los cortes de muestras incluidas en resina se obtuvieron en la talladora 11800 Piramitome (LKB) con cuchillas de vidrio fabricadas en un Kifemaker (LKB). Para la puesta en definitivo de las preparaciones sobre portaobjetos se utilizó la resina Euparal (Asco Laboratories). Los cortes se observaron en un fotomicroscopio Zeiss bajo contraste de fases y se fotografiaron en película de blanco y negro Plus X, de 100 ASA (Kodak).

En paralelo, algunos cortes semifinos y aplastados de granos de polen cultivados *in vitro* se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Serva), un fluorocromo que se une al DNA. Se preparó una solución concentrada a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en agua destilada. Esta solución es estable varios meses a 4°C. Para su uso la solución concentrada se diluyó 10 veces y se le añadió Triton X-100 al 1% para facilitar la penetración del colorante. Esta solución se añade sobre los portas a los que están adheridos los cortes y tras 10 minutos de tinción, las preparaciones se observaron en el microscopio de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ). El DNA unido al DAPI emite una fluorescencia azul ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). Se tomaron fotografías en película en blanco y negro Tri-X de 400 ASA y Kodak Gold Color de 400 ASA.

### 4.2. Tallado

Una vez localizada la zona de interés, tras la observación del corte semifino al microscopio, se procedió a delimitar una región trapezoidal de aproximadamente 1mm<sup>2</sup> de área para la posterior obtención de cortes ultrafinos. Esta operación también se realizó en el Piramitome.

### 4.3. Recubrimiento de rejillas

Las rejillas empleadas para la recolección de los cortes ultrafinos se recubrieron con una película de formvar (TAAB) para facilitar su adhesión y estabilidad en la manipulación posterior. Se utilizaron rejillas de cobre y, ocasionalmente, de oro de 200 mesh.

Se preparó una solución de formvar al 1% (p/v) en cloroformo (Merck) con la que se recubrieron portaobjetos de 76 x 26 mm. Para ello se utilizó un dispositivo que consiste en un embudo cilíndrico de diámetro ligeramente superior a la anchura de los portaobjetos, con una llave que permite la salida del líquido a velocidad constante. El embudo, después de lavarlo con cloroformo puro, se rellena con la solución de formvar en la que se sumergió un portaobjetos limpio y se abrió la llave del embudo para permitir la salida del líquido. Una vez seco, se rasparon los bordes del portaobjetos con una cuchilla y se hizo flotar la película en una superficie de agua bidestilada. La película ha de ser transparente. Sobre ella se colocaron las rejillas con su cara mate en contacto con la película. Finalmente las rejillas se recogieron introduciendo verticalmente en el agua un cristal de tamaño superior al del portaobjetos, recubierto con una etiqueta adhesiva, al que se queda adherida la película sobre la que se han colocado las rejillas.

### 4.4. Cortes ultrafinos

La pieza tallada se ajustó al cabezal del ultramicrotomo Ultracut E (Reichert) para ser cortada. Se empleó una cuchilla de diamante (Diatome), que tiene una balsa que se llena con agua bidestilada en la que flotan los cortes a medida que se desprenden del filo. Después de orientar la superficie de corte paralela al filo de la cuchilla, se seleccionó un espesor de corte de 80 nm y se aproximó la cuchilla a la pieza. Las secciones obtenidas se seleccionaron por su espesor, indicado por el color de interferencia que presentan, siendo las más adecuadas las plateadas, y se recogieron sobre la cara mate de rejillas recubiertas con formvar.

#### 4.5. Tinción de cortes ultrafinos con uranilo y plomo

##### 4.5.1. Preparación de acetato de uranilo

Se preparó una solución de acetato de uranilo al 5% (p/v) (Merck) en agua destilada, se filtró y se almacenó a 4°C protegida de la luz para evitar la formación de precipitados. Antes de su uso conviene centrifugar para evitar la posible presencia de cristales.

##### 4.5.2. Preparación de citrato de plomo

Se preparó una solución de citrato de plomo al 0.4% (p/v) (K&K) en agua. Esta es una operación delicada, pues ha de hacerse en atmosfera libre de CO<sub>2</sub>, ya que la solución puede precipitar en forma de carbonato. Se utilizó un tubo de centrifuga hervido en agua destilada con unas pastillas de sosa durante 10 min. Después de enjuagarlo con agua bidestilada hervida, se secó su interior con un chorro de nitrógeno gaseoso (N-55, SEO). Una vez seco, se añadieron en atmósfera de nitrógeno: 0.02 grs. de citrato de plomo, 5 ml. de agua bidestilada hervida y 50 µl de una solución de NaOH 10 N. La boca del tubo se selló con Parafilm M (American National Can) y se agitó enérgicamente. La solución debe quedar transparente. Finalmente, se añadieron 1-2 ml. de parafina líquida para aislar la solución del aire. Se almacena a 4°C bien tapado con parafilm.

##### 4.5.3. Tinción con uranilo y plomo

Las rejillas con los cortes se hicieron flotar sobre gotas de acetato de uranilo de aproximadamente 10 µl, dispuestas sobre una lámina de parafilm, durante 30 min. para los cortes de Epon y 20 min. para los de Lowicryl, y en oscuridad. Después se lavaron en gotas de agua bidestilada, tres veces durante 1 min. cada una y con un chorro de agua bidestilada. Se dejaron secar y a continuación se tiñeron con citrato de plomo durante 2 min. para los cortes de Epon y 30 sg. para los de Lowicryl. La tinción se llevó a cabo dentro una placa Petri con unas pastillas de sosa para evitar la precipitación del plomo. El citrato de plomo se recogió con una pipeta Pasteur cuya punta había sido estirada hasta dejar un capilar fino con el que se atravesó la capa de parafina. Después de romper la punta para eliminar los restos de parafina, se repartieron gotas de la solución de tinción sobre una capa de parafilm que cubría la

parte inferior de la placa Petri. Las rejillas se lavaron bajo un chorro de agua bidestilada y se secaron al aire.

## 5. CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES

Estas técnicas se llevaron a cabo en muestras fijadas en formaldehído 4% e incluidas en Lowicryl K4M, para mejorar el contraste de las estructuras nucleares en ensayos de inmunomarcado con oro.

### 5.1. Método de metilación-acetilación (MA) para ácidos nucleicos (Testillano y col., 1995b)

Esta citoquímica se realizó en bloque, es decir, antes de la inclusión de las muestras en Lowicryl K4M. Se partió de muestras fijadas en formaldehído y deshidratadas en una serie de metanol (ver apartados 3.1. y 3.2.), que se trataron con una mezcla de metanol:anhídrido acético (5:1; v:v) durante una noche a 25°C. El anhídrido acético (Merck) se conserva a 4°C, pero se debe sacar de la nevera unas horas antes de su uso para que se atempere. A continuación se hicieron tres lavados en metanol de 30 min. cada uno, a 4°C. Finalmente las muestras se incluyeron en Lowicryl (ver apartados 3.3 y 3.4).

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico EM 300 o 420 a 80 o 100 kV.

### 5.2. Citoquímica NAMA-Ur. específica para DNA (Testillano y col., 1991)

Para estudios ultraestructurales del patrón de cromatina, esta técnica se realizó en bloque, es decir, antes de la inclusión de las muestras en Lowicryl. Los tejidos fijados en formaldehído 4% (apartado 3.1) se trataron con una solución de hidróxido sódico 0.5 N en formaldehído al 4% durante una noche a temperatura ambiente. Esta solución se prepara mezclando NaOH 2% y formaldehído 37% (Merck) en la proporción 10:1, v:v. Después se lavaron en agua destilada durante 20 min. con un cambio transcurridos los primeros 10 min. A continuación se trataron con ácido acético al 1% en tres cambios de 10 min. y se lavaron en agua destilada. Se deshidrataron en una serie de metanol: metanol 70% durante 1 h. y metanol 100% durante 90 min. con cambios cada 30 min. y se incubaron en una mezcla de metanol:anhídrido acético (5:1, v:v) durante una noche a 25°C. Finalmente se hicieron

tres lavados en metanol de 30 min. cada uno y las muestras se incluyeron en Lowicryl (ver apartados 3.3 y 3.4)

Para la combinación de esta citoquímica con inmunolocalizaciones, la técnica se realizó sobre cortes ultrafinos de muestras fijadas en formaldehído e incluídas en Lowicryl (ver apartado 3), después de la inmunodetección. Los cortes se recogieron en rejillas de oro y se flotaron en gotas de: agua bidestilada durante 1 min. y una mezcla de NaOH 0.5 N en formaldehído 4% durante tres horas. Después de dos lavados en agua destilada, las rejillas se secaron al aire. A continuación se trataron como sigue: ácido acético 1%, tres veces, durante 1 min. cada una, tres lavados en agua destilada y secado al aire. Luego se deshidrataron en metanol 70% durante 15 min. y metanol 100%, tres cambios de 15 min. cada uno (las rejillas no flotan en metanol puro, por tanto se sumergen en él con los cortes hacia arriba) y se incubaron en una mezcla de metanol:anhídrido acético, 5:1 (v:v) durante una noche. Finalmente las rejillas se lavaron en agua bidestilada, se dejaron secar y se tiñeron con acetato de uranilo 5% durante 1 h. a 60°C.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico EM 300 o 420 a 80 o 100 kV.

### 5.3. Tinción regresiva de EDTA (Bernhard, 1969)

Esta tinción, preferencial para ribonucleoproteínas, se realizó sobre rejillas previamente incubadas con anticuerpos anti-RNA o anti-snRNPs para estudiar la relación entre estructura y función en la región intercromatínica.

Se preparó una solución 0.02 M de una sal disódica del ácido etilendiamino tetracético (EDTA) en agua a pH 7. Esta solución se mantiene a temperatura ambiente y es estable durante meses.

Las rejillas con cortes ultrafinos de Lowicryl se flotaron sobre gotas de acetato de uranilo 5% en agua durante 20 min. en oscuridad. Después de lavar las rejillas en agua destilada y dejarlas secar al aire, se depositaron sobre gotas de EDTA 0.02 M durante 5-10 seg. A continuación se lavaron en agua destilada y se dejaron secar. Finalmente las rejillas se contrastaron con citrato de plomo 0.4%, depositándolas sobre gotas de este agente de tinción durante 30 seg; se lavaron en agua destilada y se dejaron secar al aire.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico EM 300 o 420 a 80 o 100 kV.

#### 5.4. Digestión con DNasa I

La digestión con DNasa I se realizó como control de la especificidad de los anticuerpos anti-RNA para demostrar que no había reacción cruzada de los mismos con DNA (Mena y col., 1994).

Cada rejilla se incubó en una solución que contenía 20 U de DNasa I, libre de RNasas (Boehringer-Mannheim), 30 U de RNasin (Promega) en un tampón constituido por 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 6 mM Tris-Cl, pH 7.5. La incubación se realizó durante 2 h. a 37°C. Después se lavaron dos veces en el tampón utilizado para diluir la DNasa, a temperatura ambiente, y se pasaron a PBS para iniciar el protocolo de inmunolocalización de RNA.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico EM 300 o 420 a 80 o 100 kV.

### 6. INMUNOCITOQUÍMICAS A NIVEL DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La localización inmunocitoquímica de diferentes antígenos nucleares se realizó sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M, recogidos en rejillas de cobre de 200 mesh. Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones fueron:

anti-DNA, anticuerpo monoclonal (IgM) contra el DNA mono y bicatenario (Boehringer). Concentración: 20-50 µg/ml en PBS.

anti-histona H2B, anticuerpo policlonal de conejo (Muller y col, 1991), diluido al 50% en PBS con 1% de BSA.

anti-histona H4, anticuerpo policlonal de conejo (Muller y col, 1991), diluido al 50% en PBS con 1% de BSA.

anti-bromo-deoxiuridina, anticuerpo monoclonal (Amershan). Se utilizó sin diluir.

anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), anticuerpo monoclonal, clon PC10 (Boehringer). Concentración: 10-100 µg/ml.

anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), anticuerpo monoclonal, clon 19F4 (Boehringer). Concentración: 10-100 µg/ml.

anti-híbridos DNA/RNA, producido en cabra (Kitagawa y Stollar, 1982; Testillano y col., 1994). Dilución: 1/1.000 en PBS.

7.13, anticuerpo monoclonal contra la proteína D común a los snRNPs U1,U2, U4/U6 y U5 (Billings y col., 1985; Testillano y col., 1993b). Se utilizó sin diluir.

anti-NOR-90, suero humano autoinmune que reconoce el factor hUBF (Chan y col., 1991). Dilución: 1/100 en PBS.

anti-B36, anticuerpo monoclonal contra la proteína fibrilarina (Christensen y col., 1986; Testillano y col., 1992). Dilución: 1/150 en PBS.

anti-RNA, autoanticuerpo monoclonal (Eilat y Fischer, 1991; Mena y col., 1994). Se utilizó sin diluir.

Para revelar los anticuerpos primarios se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a partículas de oro (Biocell). Éstos fueron los siguientes:

anti-IgM de ratón, conjugado a partículas de oro de 10 nm de diámetro.

anti-IgM de ratón, conjugado a partículas de oro de 15 nm de diámetro. Este anticuerpo se utilizó para revelar el anticuerpo anti-DNA en la doble inmunolocalización de DNA/histonas y DNA/PCNA. En estos casos ambos anticuerpos primarios se mezclaron manteniendo las concentraciones de trabajo de la inmunolocalización simple.

anti-IgG de ratón, conjugado a partículas de oro de 10 nm de diámetro.

anti-conejo, conjugado a partículas de oro de 10 nm de diámetro.

anti-humano, conjugado a partículas de oro de 10 nm de diámetro.

anti-cabra, conjugado a partículas de oro de 10 nm de diámetro. Para el doble inmunomarcado anti-NOR90/anti-híbridos DNA/RNA, se utilizó un anticuerpo anti-cabra conjugado a partículas de oro de 5 nm.

Estos anticuerpos se diluyeron 20 veces en PBS en todos los casos, salvo el anti-cabra que se diluyó en PBS con 1% de BSA.

El protocolo que se siguió fue el siguiente: las rejillas se flotaron sucesivamente en gotas de agua destilada durante 1 min., PBS durante 1 min. y BSA al 5% en PBS durante 5 min. A continuación las rejillas se incubaron con el primer anticuerpo durante 1 h. a temperatura ambiente, en la dilución adecuada. Después de lavar el primer anticuerpo en PBS, tres veces durante 1 min. cada una, se incubaron con el segundo anticuerpo durante 45 min. a temperatura ambiente. Finalmente las rejillas se lavaron en PBS y agua destilada y se tiñeron con uranilo y plomo (ver apartado 4.5.3).

En todos los casos el inmunomarcado con oro se combinó con la citoquímica MA realizada en bloque. Ocasionalmente se realizaron otras citoquímicas descritas en el capítulo anterior. Éstas combinaciones fueron: inmunolocalización de histonas y DNA y tinción con NAMA-Ur en corte; inmunolocalización de RNA después de digestión con DNasa e inmunodetección de RNA y snRNPs y posterior tinción con EDTA.

Los controles se hicieron reemplazando el primer anticuerpo por PBS. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 300 o 420 a 80 o 100 KV.

## **7. REACCIÓN DE TERMINAL DEOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA (TdT) *IN SITU***

La reacción de TdT *in situ* (Thiry, 1992b) se realizó en polen sobre cortes de Lowicryl, siguiendo una modificación para material vegetal (Testillano y col., 1995a).

Las secciones ultrafinas de Lowicryl se incubaron en una solución que contenía TdT 125 U/ml (Boehringer); 5-bromo-deoxi-uridina-trifosfato (BrUTP) 20  $\mu$ M; dATP, dGTP, dCTP 4 $\mu$ M cada nucleótido y CoCl<sub>2</sub> 2.5 mM en un tampón apropiado

[cacodilato potásico 200  $\mu$ M, Tris-HCl 25 mM, BSA 0.25 mg/ml, pH 6.6], durante 30 min. a 37°C. Después de lavar en agua destilada y PBS, los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Amersham) sin diluir, durante 1 h., que se reveló con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado a partículas de oro de 10 nm (BioCell) diluido 20 veces en PBS. Finalmente los cortes se lavaron en PBS y agua destilada, se secaron al aire y se tiñeron con uranilo y plomo (ver apartado 4.5.3.).

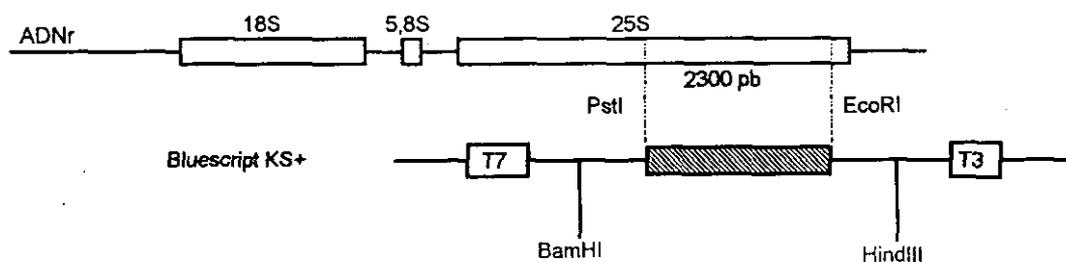
En los controles se utilizó una solución de incubación sin la enzima.

## 8. OBTENCIÓN Y MARCADO DE SONDAS RIBOSÓMICAS PARA HIBRIDACIÓN *IN SITU*

### 8.1. Obtención de las sondas

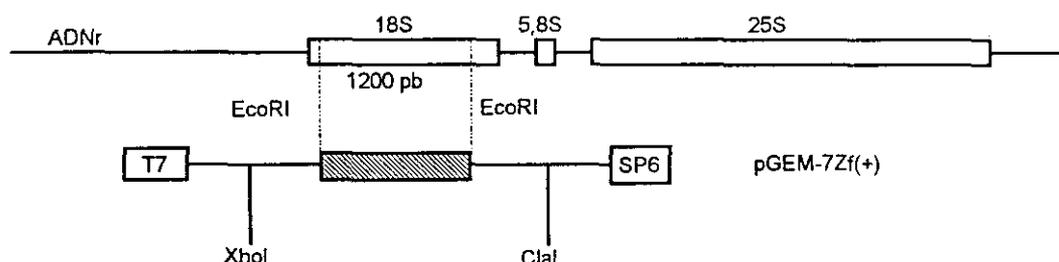
Para la síntesis de las sondas de RNA, utilizadas en los experimentos de hibridación *in situ*, se partió de plásmidos recombinantes que contenían fragmentos de DNA ribosómico. Estos fragmentos y los plásmidos que los contenían fueron:

- 1) el fragmento PstI-EcoRI, de 2.3 Kb, correspondiente a parte del gen 25S de la unidad ribosómica de *Arabidopsis thaliana* L., contenido en el plásmido Bluescript KS+, con resistencia a ampicilina (Gruendler y col., 1991).



**Figura 1:** Mapa del DNA ribosómico de *Arabidopsis thaliana* L. Se indica el fragmento del gen 25S clonado en Bluescript KS+. La polimerasa T7 sintetiza la sonda sense y la T3 la sonda antisense.

2) el fragmento EcoRI, de 1.2 Kb, que cubre casi toda la secuencia del gen 18S de la unidad ribosómica de *Raphanus sativus* L., contenido en el plásmido pGEM-7Zf(+), con resistencia a ampicilina (Delseny y col., 1983).



**Figura 2:** Mapa del DNA ribosómico de *Raphanus sativus* L. Se indica el fragmento del gen 18S clonado en pGEM-7Zf(+). La polimerasa T7 sintetiza la sonda sense y la SP6 la sonda antisense.

Con estos plásmidos se transformaron bacterias *E. coli* de la estirpe HB 101 con objeto de amplificar el DNA ribosómico contenido en ellos.

### 8.1.1. Transformación bacteriana

Se cultivaron las bacterias en medio LB [Bacto triptona 1% (Difco Laboratories), extracto de levadura 0.5% (Difco Lab.) y NaCl 1% (Merck), pH 7.5]. Cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm fue próxima a 0.6, se procedió a obtener células competentes. Para ello se recolectaron 40 ml del cultivo y las bacterias se resuspendieron en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM (Merck) frío, manteniéndose durante 20-30 min. a 4°C; se recolectaron de nuevo y se resuspendieron en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Alícuotas de 200 µl de esta suspensión de células, ya competentes, se mezclaron con 10-50 ng de DNA plasmídico disuelto en TE [Tris-Cl 10 mM (Merck), ácido etilendiamino tetra-acético 1 mM (EDTA, Serva), pH 8]. La mezcla se mantuvo a 4°C durante 30 min. Al cabo de este tiempo se incubó durante 2 min. a 42°C y se transfirió inmediatamente a 4°C. Se añadió 1 ml de medio LB y el cultivo se incubó durante 1 h. a 37°C. A continuación se inocularon 200 µl del cultivo anterior en una placa preparada con medio LB suplementado con agar noble 1.5% (Difco Lab.) y ampicilina 100 µg/ml, incubándose durante una noche a 37°C.

## 8.1.2. Preparación de DNA plasmídico

### 8.1.2.1. Crecimiento, recolección y lisis alcalina de las bacterias

A partir de una colonia aislada de bacterias transformadas, se inocularon 10 ml. de medio LB suplementado con ampicilina y se incubaron durante 4 h. a 37°C. Transcurrido este tiempo el cultivo se añadió a 90 ml. del mismo medio. Se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente las bacterias se recolectaron por centrifugación durante 6 min. a 6.000 rpm y a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 3 ml. de TE. Para el lisado alcalino de las bacterias se añadieron dos volúmenes de solución SES [NaOH 0.2 N (Merck), EDTA 10 mM, dodecil sulfato sódico 1% (SDS, Bio-Rad)], agitando suavemente y manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 min. Esta mezcla se neutralizó por adición de 0.5 volúmenes de una solución de acetato potásico 3 M (Merck), pH 4.8. Al cabo de 10 min. de neutralización en hielo, se formó un precipitado que se eliminó mediante centrifugación durante 20 min. a 5.000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y el DNA bicatenario se precipitó con 2 volúmenes de etanol puro durante 15 min. a 4°C. El precipitado se recuperó mediante centrifugación durante 10 min. a 10.000 rpm y a 4°C, se lavó con etanol al 70% y se sometió a centrifugación en idénticas condiciones. A continuación el DNA se resuspendió en 3.2 ml. de TE y se procedió a la purificación del DNA plasmídico por centrifugación en gradiente de CsCl-bromuro de etidio.

### 8.1.2.2. Purificación de DNA plasmídico

Por cada mililitro de DNA en solución, se añadió 1 gr de CsCl (BRL). Una vez disuelto, se añadieron 200 µl de una solución concentrada (10 mg/ml en agua) de bromuro de etidio (Sigma). Inmediatamente ambas soluciones se mezclaron por agitación y se centrifugó 5 min. a 5.000 rpm. Se recogió la zona clara superior, se transfirió a tubos de centrifuga "quick-seal" (Beckman) y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman TL-100 durante 3.30 hs. a 100.000 rpm y a 18°C. Se obtuvieron dos bandas de DNA en el centro del gradiente; la superior contenía DNA bacteriano y la inferior DNA plasmídico. Además se formó un precipitado formado por complejos RNA/bromuro de etidio. Se recogió la banda de DNA plasmídico con una jeringa y se diluyó en un volumen igual de TE. El bromuro de etidio se eliminó mediante lavados con una solución saturada de 1-butanol en TE. Para ello se añadió 1 volumen de esta solución, se mezcló bien con la solución de DNA y se dejó reposar hasta que se separaron dos fases. Se eliminó la superior que contenía butanol coloreado por bromuro de etidio y se repitió la operación hasta que el butanol no

extrajo más bromuro de etidio. A continuación se añadió 1 volumen de TE, 1/20 volúmenes de acetato de sodio 3 M (Merck) y 2.5 volúmenes de etanol puro. Se centrifugó durante 15 min. a 10.000 rpm y el DNA plasmídico precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó durante 5 min. a 10.000 rpm. Finalmente el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de TE.

La concentración del DNA plasmídico obtenido se determinó mediante valoración espectrofotométrica, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (1 D.O.) a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA.

Como control, el DNA plasmídico se digirió con los enzimas de restricción que hacen salir el inserto. Los fragmentos de DNA obtenidos así como el patrón (DNA del fago λ digerido con HindIII) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (Bio-Rad) en tampón TAE [Tris-acético 40 mM, EDTA 1 mM], sometidos a una diferencia de potencial de 60 V durante 30 min. Finalmente el gel se tiñió con una solución de bromuro de etidio 1µg/ml durante 10 min. y las bandas obtenidas se observaron bajo luz U.V.

## **8.2. Síntesis y marcado de las sondas de RNA**

La preparación de las sondas de RNA se llevó a cabo a partir de DNA plasmídico linearizado mediante transcripción *in vitro* en presencia de UTP marcado con digoxigenina, según las instrucciones de un preparado comercial de Boehringer. Se linearizaron 2 µg de DNA plasmídico mediante digestión con el enzima de restricción que corta en el sitio más alejado del correspondiente promotor de la RNA polimerasa utilizado en cada caso (ver figuras 1 y 2), durante 1 h. a 37°C. A continuación el DNA se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo. Para ello se añadió 1 volumen de fenol, pH 8 (Apligene) y se separaron dos fases mediante centrifugación. Se recogió la fase superior, se le añadió 1 volumen de cloroformo (Merck), se centrifugó y se recuperó la fase superior. El DNA se precipitó en 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol puro. Al DNA precipitado se le añadió una solución que contenía ATP 1mM, CTP 1 mM, GTP 1mM, UTP 0.65 mM, 11-dig-UTP 0.35 mM y 40 unidades de SP6, T7 o T3, en tampón de transcripción [Tris-Cl 40 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, dithiothreitol (DTT) 10 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM e inhibidor de RNasa 1 unidad/µl]. Esta mezcla se incubó durante 2 hs. a 37°C. Transcurrido este tiempo, el DNA se eliminó mediante incubación con 2 µl de DNasa I, libre de RNasa (Boehringer) durante 15 min. a la

misma temperatura. La reacción se paró con 2  $\mu$ l de EDTA 200 mM, pH 8 y el RNA se precipitó con 2.5  $\mu$ l de LiCl 4 M y 75  $\mu$ l de etanol puro. El RNA precipitado se resuspendió en agua tratada con dietilpírocarbonato al 0.1% (v/v) (DEPC, Sigma).

Para facilitar la penetración en el tejido, el tamaño de las sondas se redujo hasta aproximadamente 200 bases mediante hidrólisis carbonada, según el método descrito por Cox y col., 1984.

La concentración de las sondas se determinó mediante valoración espectrofotométrica.

## 9. HIBRIDACIÓN *IN SITU* Y MICROSCOPIA CONFOCAL

### 9.1. Preparación de las muestras para hibridación *in situ*

Los experimentos de hibridación *in situ* se llevaron a cabo en tejidos meristemáticos de raíz de cebolla. Los 3-4 mm apicales de la raíz se cortaron y se fijaron en una mezcla de formaldehído al 4% (p/v) (preparado a partir de paraformaldehído, Schuchardt München) y glutaraldehído al 0.1% (v/v) (TAAB) en PBS, pH 7.3, durante 1 h. a temperatura ambiente y en agitación. Después de lavar tres veces con PBS, se obtuvieron cortes longitudinales de 30  $\mu$ m de espesor en un vibratomo Bio-Rad Micro-Cut H1200. Las secciones se depositaron sobre portas multitest de ocho pocillos (Flow laboratories) previamente recubiertos mediante inmersión en una solución de 3-amino-propil-trietoxi-silano al 2% (v/v) (Sigma) en acetona y activados con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en PBS durante 30 min. Los cortes se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C.

Antes de su uso, las secciones se trataron con una solución de borohidruro de sodio (1mg/ml en PBS) dos veces, 15 min. cada una, para eliminar la autofluorescencia debida al glutaraldehído y después se permeabilizaron con celulasa al 2% (p/v) (Onozuka R-10) en TBS [Tris-Cl 25 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, KCl 3 mM] durante 1 h.

### 9.2. Hibridación *in situ*

Previa a la hibridación RNA/DNA se procedió a la desnaturalización del DNA del tejido por calor, sumergiendo los portas durante 5 min. en 0.1 x SSC [1 x SSC:

NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM] a 98°C e inmediatamente en el mismo tampón, previamente refrigerado, para evitar la renaturalización.

Los cortes se incubaron toda la noche a 37°C en cámara húmeda con una solución de hibridación recientemente preparada que contenía 10 ng/μl de sonda marcada con digoxigenina, 50 ng/μl de DNA de esperma de salmón, formamida al 25% (v/v) (Sigma), sulfato de dextrano al 10% (p/v) (Pharmacia), NaCl 300 mM en tampón [PIPES 10 mM (Sigma) pH 8, EDTA 1mM]. Para la hibridación RNA/RNA se utilizaron sondas antisense; para la hibridación RNA/DNA se utilizaron sondas sense.

Una vez producida la reacción de hibridación, los portas se lavaron en 0.1 x SSC a 50°C durante 90 min., cambiando el tampón transcurridos los primeros 45 min. Los híbridos se detectaron incubando los cortes con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fluoresceína, producidos en oveja (Boehringer) diluidos 50 veces en TBS con 3% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) durante 1h. El anticuerpo se lavó en TBS durante 20 min. en jarras coplin y con agitación magnética. La señal fluorescente se amplificó utilizando sucesivamente anticuerpos anti-oveja conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) producidos en conejo (Sigma) y anticuerpos anti-conejo conjugados con FITC (Sigma) diluidos 50 y 16 veces, respectivamente, en TBS con 3% de BSA, durante 45 min. cada uno y con lavados en TBS entre ellos. Después del último lavado las preparaciones se montaron con glicerol y se sellaron con laca de uñas.

En los controles se utilizó una solución de hibridación sin sonda.

### **9.3. Microscopía confocal**

Las preparaciones se observaron en un microscopio invertido Axiovert 135 Zeiss equipado para epifluorescencia, usando un objetivo 63 x con apertura numérica (AN) de 1.4. El microscopio está acoplado a una cabeza de barrido láser confocal Bio-Rad MRC-1000 provista de un láser Ar 25 mW multilínea con emisión a  $\lambda = 488$  y 514 nm. La captura y tratamiento de las imágenes se realizó bajo el control de un sistema informático utilizando el programa Bio-Rad COMOS. Se tomaron series de entre 10 y 15 secciones ópticas en el eje z, con una separación entre ellas de 1 μm. La impresión de las imágenes se hizo en una videoimpresora (SONY).

## 10. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ULTRAESTRUCTURAL

### 10.1. Preparación de los cortes para hibridación *in situ*

Los cortes ultrafinos de muestras de meristemas de raíz de cebolla y granos de polen de pimiento, tratadas con el método de metilación-acetilación e incluidos en Lowicryl K4M se recogieron en rejillas de oro y se incubaron en una solución de proteinasa K 1 µg/ml en un tampón apropiado [EDTA 0.05 M, Tris-Cl 0.1 M, pH 8] durante 1 h. a temperatura ambiente. Previa a su utilización, la solución de la proteinasa K se estabilizó a 37°C durante 2 hs. Finalmente las rejillas se lavaron en el tampón utilizado para diluir la proteinasa K y en agua, y se dejaron secar al aire.

### 10.2. Hibridación *in situ*

Previo a la hibridación RNA/DNA se procedió a la desnaturalización del DNA de las secciones mediante tratamiento con NaOH 0.5 N durante 4 min. Después las rejillas se lavaron en agua y se dejaron secar al aire.

Los cortes ultrafinos se incubaron toda la noche a 50°C en cámara húmeda con una solución de hibridación recientemente preparada que contenía 4 ng/µl de sonda marcada con digoxigenina, 50 ng/µl de DNA de esperma de salmón, formamida al 25% (v/v) (Sigma), sulfato de dextrano al 10% (p/v) (Pharmacia), NaCl 300 mM en tampón [PIPES 10 mM (Sigma) pH 8, EDTA 1mM]. Para la hibridación RNA/DNA se utilizaron sondas sense y para la hibridación RNA/RNA sondas antisense.

Una vez producida la reacción de hibridación, las rejillas se lavaron en 4 x SSC, 2 x SSC, a temperatura ambiente durante 8 min., en ambos casos, con cambios cada 2 min. y SSC a 50°C durante 2 h. cambiando en tampón transcurridos los primeros 60 min. Para la detección de los híbridos las rejillas se hicieron flotar en gotas de PBS durante 1 min. y BSA 5% en PBS durante 5 min. y se incubaron con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con partículas de oro de 10 nm (BioCell), diluidos 25 veces en una solución de BSA 1% en PBS durante 45 min. Después las rejillas se lavaron en PBS y en agua destilada y se tiñeron con uranilo y plomo (ver apartado 4.5.3.).

En los controles se utilizó una solución de hibridación sin sonda.

Los cortes se observaron en un microscopio electrónico EM 300 o 420 a 100kV.

## 11. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE MEMBRANAS

Para la realización de los ensayos de inmunotransferencia se utilizaron extractos de proteínas totales de la zona meristemática de raíces de cebolla. Se cortaron los 4-5 mm apicales e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero. Las células se lisaron en tampón de ruptura cuyos componentes y concentraciones finales fueron: Tris-Cl 20 mM pH 8.0, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. El lisado se calentó a 100°C durante 5 min., se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización. La cuantificación de proteínas presentes en el extracto se realizó mediante valoración espectrofotométrica de acuerdo al método descrito por Bradford, 1976 y siguiendo las instrucciones de un preparado comercial (Bio-Rad protein assay).

Alicuotas de los extractos totales de proteínas (15  $\mu$ g) así como de las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular (broad range, Bio-Rad) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 15% (p/v) de acuerdo al método previamente descrito por Laemli, 1970. Una vez separadas, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de immobilon-P (Millipore Corporation). A continuación las membranas se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en una solución de leche desnatada al 2% (p/v) y Tween-20 (Sigma) 0.05% (v/v) en PBS. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en la solución anterior durante 2 h. a temperatura ambiente y en agitación.

Los anticuerpos primarios utilizados así como las diluciones finales utilizadas se relacionan a continuación:

anti-histona H2B, anticuerpo policlonal de conejo (Muller y col., 1991). Dilución 1/2.500.

anti-histona H4, anticuerpo policlonal de conejo (Muller y col., 1991). Dilución 1/5.000.

Después de lavar las membranas tres veces en una solución de leche desnatada al 0.2% (p/v) y Tween-20 al 0.5% (v/v) en PBS durante 10 min., se incubaron durante 2 h. con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1/1.000 en la misma solución utilizada para diluir los anticuerpos primarios. A continuación se lavaron tres veces con la misma solución empleada para lavar los anticuerpos primarios, durante 10 min. El revelado del anticuerpo secundario se realizó mediante incubación con una mezcla de azul de nitrotetrazolio (100  $\mu$ m/ml) (NTB, Sigma) y bromocloroindolil sulfato (50  $\mu$ g/ml) (BCIP, Sigma) en un tampón apropiado [NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4mM].

El patrón de las proteínas totales transferidas se determinó mediante tinción con amido black (Merck).

## **12. CULTIVO *IN VITRO* DE POLEN AISLADO EN MEDIO LÍQUIDO**

### **12.1. Obtención de los granos de polen y puesta en cultivo**

Las anteras se extrajeron asépticamente de botones florales pretratados a 4°C durante 2-4 días. Los granos de polen se liberaron mediante aplastado suave en una solución de Manitol 0.4 M. Después de filtrar para eliminar los restos de anteras, se centrifugó a 500 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se añadió manitol 0.4 M y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente los granos de polen aislados se resuspendieron en medio AM4 (Benito-Moreno y col, 1988) que contenía Manitol 0.4 M y los componentes del medio de Murasighe y Skoog (MS) (Murasighe y Skoog, 1962) a la concentración recomendada por el proveedor (Flow) a pH 7.0, o en una modificación del mismo que además contenía sacarosa 40 mM. La incubación se realizó a 25°C y en oscuridad. Alternativamente los granos de polen se resuspendieron en el medio M1S (Benito-Moreno y col, 1988), que contiene Sacarosa 0.25 M, KNO<sub>3</sub> (100 mg/L), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (100 mg/L), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (34.7 mg/L), KCl (6.5 mg/L), MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (3.5 mg/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30 mg/L) y los componentes del medio Plant Salt Mixture a la concentración recomendada por el proveedor (Flow), a pH 7.0. La incubación se realizó a 37°C durante los primeros dos días y después a 25°C y en oscuridad.

## 12.2. Seguimiento de los cultivos: tinción con DAPI

Se tomaron muestras de granos de polen antes de iniciar el cultivo, así como en diferentes momentos del mismo para estudiar su evolución y se mezclaron con la solución de DAPI (ver apartado 4.1.) durante 10 min. Después, se extendieron en un portaobjetos y se observaron en el microscopio de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta ( $\lambda = 366$  nm). Se tomaron fotografías en película en blanco y negro Tri-X de 400 ASA y Kodak Gold Color de 400 ASA.

## 13. ANÁLISIS CUANTITATIVO

### 13.1. Inmunomarcado con anticuerpos anti-histonas y anti-DNA

Se determinó la densidad de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  en las masas de cromatina condensada, región intercromatínica, los componentes nucleolares (centros fibrilares homogéneos y heterogéneos y componente fibrilar denso), citoplasma y vacuolas citoplásmicas; el marcado en estas últimas se utilizó para estimar la medida del ruido de fondo. El muestreo se llevó a cabo sobre fotografías de raíces de cebolla tratadas con metilación-acetilación, para una correcta distinción de los diferentes compartimentos celulares, perfilando al azar áreas de cada uno de ellos utilizando para ello una malla trasparente puesta sobre la foto. Una vez contados el número de intersecciones de la cuadrícula, para estimar el área medida, y de partículas de oro que caen dentro del área perfilada, se calcularon las densidades mediante un programa de BASIC elaborado por el Dr. Jaime Renau-Piqueras (Centro de Investigación del Hospital La Fe, Valencia). El tamaño mínimo de muestra se determina por la técnica de la media progresiva. Los datos obtenidos se representaron gráficamente en el programa Harvard Graphics 3.0.

### 13.2. Inmunomarcado con anti-PCNA

Se determinó la distribución del marcado obtenido con anticuerpos anti-PCNA en microsporas vacuoladas tardías y células vegetativa y generativa de granos de polen bicelulares jóvenes en muestras tratadas con el método de metilación-acetilación. Para ello se tomaron 15 fotografías al mismo aumento de estas fases y sobre ellas se colocó una malla transparente con un tamaño de cuadrícula de 5 x 5 mm. (Renau-Piqueras y col., 1989). Se perfilaron áreas de la región intercromatínica y se contó en cada cuadrado de la zona delimitada el número de partículas de oro. Se

obtuvo de este modo una distribución que se representó gráficamente en el programa Harvard Graphics 3.0. considerando como marcado aislado los cuadrados con 1 o 2 partículas de oro y como marcado agrupado, los cuadrados con 3 o más partículas de oro. Estos datos se expresaron en tanto por ciento en relación al área medida.

## RESULTADOS

# RESULTADOS

## 1. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DEL CICLO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZ DE CEBOLLA

Se utilizaron ápices meristemáticos de raíces de cebolla para la puesta a punto de algunas de las técnicas incluidas en esta memoria de Tesis y para la búsqueda de marcadores de ciclo celular. Se trata de un material de fácil y rápida disponibilidad en el laboratorio en todo momento, cuyo ciclo celular está bien caracterizado (De la Torre y González, 1979; De la Torre y col., 1985), y cuya organización nuclear ha sido objeto de estudio en nuestro grupo de investigación durante años (Risueño y Medina, 1986; Risueño y Testillano, 1994). Este material se ha utilizado para desarrollar métodos para el estudio del patrón de cromatina, localización de la cromatina replicada, composición de la región intercromatínica, organización nucleolar y localización de la cromatina ribosómica, en relación a los cambios en el estado de actividad que se suceden durante el ciclo celular.

Para los estudios de microscopía electrónica los 3 mm apicales de las raíces germinadas, y en ocasiones las raíces no brotadas extraídas de los bulbos, se incluyeron en la resina Lowicryl K4M. Se realizaron cortes semifinos de  $1\mu\text{m}$  de estas inclusiones, se tiñeron con DAPI y se observaron bajo irradiación ultravioleta con objeto de seleccionar células meristemáticas de raíz de cebolla en distintas fases del ciclo celular. Los cortes semifinos, observados en un microscopio óptico bajo contraste de fase proporcionaron información adicional a la obtenida mediante tinción con DAPI y además sirvieron como control de la fijación.

El DAPI es un fluorocromo que se une al DNA y bajo irradiación ultravioleta emite una fluorescencia azul cuya intensidad es directamente proporcional al estado de condensación de la cromatina. En secciones longitudinales de meristemas de raíz de cebolla, los núcleos celulares así como los cromosomas mitóticos fluorescen intensamente (Fig. 3). La máxima intensidad de fluorescencia, que indica mayor grado de condensación del DNA, se encontró en los cromosomas mitóticos. Se identificaron células meristemáticas, de forma isodiamétrica, en diferentes momentos del ciclo celular (G1, S, G2 y Mitosis), alineadas longitudinalmente entre las células epidérmicas, más alargadas.

En cortes semifinos de muestras tratadas con la citoquímica NAMA-Ur, específica para DNA, se apreciaron cambios en el patrón de cromatina durante la progresión del ciclo celular y la disposición de los cromosomas durante la mitosis. La cromatina y los cromosomas mitóticos están específicamente teñidos. A medida que las células entran en profase (Fig. 4) la cromatina se condensa. En metafase (Fig. 5) los cromosomas alcanzan el mayor grado de condensación y se disponen en la placa ecuatorial. Durante anafase (Fig. 6) las cromátidas hermanas se separan hacia polos opuestos. En telofase (Fig. 7) el proceso de división se completa y comienza a formarse la pared que separa a las dos células hijas. En G1 (Figs. 8 y 9) la cromatina se descondensa y se rodea totalmente de envoltura nuclear. El núcleo presenta una característica forma lobulada. El tamaño celular aumenta durante la progresión de la fase S (Figs. 10 y 11) y el núcleo adopta una forma elíptica. El mayor tamaño celular se alcanza en G2 (Fig. 12).

## 2. CRIOPROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El Lowicryl es una resina hidrofílica que polimeriza a bajas temperaturas bajo luz ultravioleta y en ausencia de oxígeno. Fue seleccionada para los estudios inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* a nivel de microscopía electrónica en base a esas propiedades. La crioinclusión en Lowicryl de muestras fijadas en formaldehído proporcionó una buena preservación ultraestructural a la vez que el mantenimiento de las propiedades antigénicas y químicas. La inclusión de material vegetal en Lowicryl fue desarrollada por primera vez en nuestro laboratorio (Testillano y col., 1991).

### 2.1. Ultraestructura nuclear tras inclusión en Lowicryl

En cortes ultrafinos teñidos con uranilo y plomo, el nucleolo (NU) y la región intercromatínica (RI) aparecen contrastados (Fig. 13), sin embargo no es fácil distinguir entre las estructuras granulares y fibrilares, como ocurre en muestras procesadas para microscopía electrónica convencional. Los centros fibrilares aparecen como áreas claras a los electrones (flecha), si bien no es posible determinar si se trata de centros fibrilares homogéneos o heterogéneos (Fig. 13). Las masas de cromatina condensada (CR) presentan un bajo contraste (Fig. 13). Estos inconvenientes llevaron a combinar la fijación con formaldehído e inclusión en Lowicryl con citoquímicas ultraestructurales, con objeto de obtener una mayor resolución en el contraste de los diferentes compartimentos nucleares y, de este

modo, una correcta asignación del marcado con oro en los ensayos inmunocitoquímicos, inmunocitoquímicas moleculares realizadas *in situ* e hibridación *in situ*.

### 3. CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES

La inclusión en Lowicryl se combinó con técnicas citoquímicas desarrolladas en nuestro laboratorio, que se realizaron bien en bloque, es decir antes de la inclusión de las muestras, bien sobre los cortes ultrafinos. El tratamiento de metilación-acetilación (MA), que contrasta preferencialmente las estructuras que contienen ácidos nucleicos y la técnica NAMA-Ur, específica para DNA nos sirvieron para determinar la composición química de los diferentes compartimentos nucleares y estudiar los cambios en la organización funcional del núcleo a lo largo del ciclo celular de las células en estudio.

#### 3.1. Método de metilación-acetilación (MA) para ácidos nucleicos

Esta técnica consiste en un tratamiento de las muestras fijadas en formaldehído con una mezcla de metanol y anhídrido acético, que bloquea los grupos de las proteínas que reaccionan con el uranilo, por lo que preferencialmente se tiñen los ácidos nucleicos, revelando de este modo las estructuras que contienen DNA y RNA.

Este tratamiento nos ha permitido estudiar la estructura fina del nucleolo y región intercromatínica gracias a la discriminación entre estructuras granulares y fibrilares, y el patrón de cromatina debido al alto contraste que proporciona a las masas de cromatina condensada.

En cortes ultrafinos de muestras tratadas con esta técnica, teñidos con uranilo y plomo, se pueden reconocer con facilidad los distintos componentes nucleolares (Fig. 14a y b). Los centros fibrilares aparecen como pequeñas zonas claras a los electrones en cuyo interior se aprecia material fibrilar, en el caso de los centros fibrilares homogéneos (doble flecha), o pequeñas áreas de mayor contraste, correspondientes a inclusiones de cromatina condensada, rodeadas de material fibrilar, en el caso de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha). Rodeando a los centros fibrilares se encuentra el componente fibrilar denso (F), que a

#### 4.1.1. Inmunomarcado sobre cortes de muestras tratadas con la citoquímica MA

Las partículas de oro que revelan la posición de la histona H4 se localizaron principalmente sobre las masas de cromatina condensada (CR), las cuales mostraron un buen contraste por el tratamiento de metilación-acetilación. Se observaron diferencias en el patrón de cromatina entre las células meristemáticas de raíz de cebolla (Fig. 18) y las microsporas vacuoladas de pimiento (Fig. 19). Las células meristemáticas de raíz de cebolla en interfase presentan grandes masas de cromatina condensada, mientras que en polen de pimiento la cromatina está más dispersa.

La región intercromatínica (RI) en microsporas vacuoladas (Fig. 19) es más rica en estructuras granulares (círculos) y fibrilares que en células meristemáticas de raíz de cebolla (Fig. 18). Algunas fibras de la región intercromatínica (flechas) se marcan con anticuerpos anti-histona H4.

En el nucleolo (NU) el marcado se localizó en las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha), centros fibrilares homogéneos (doble flecha) y ciertas regiones del componente fibrilar denso (flechas abiertas). El componente granular (G) está prácticamente libre de marcado.

El patrón de distribución ultraestructural de la histona H2B (Fig. 20) es similar al obtenido tras inmunomarcado con anticuerpos anti-histona H4.

Se determinó la densidad de partículas de oro, después de inmunomarcado con anticuerpos anti-histonas H4 (Fig. 27) y H2B (Fig. 28), en diferentes compartimentos celulares: cromatina condensada (CR), región intercromatínica (RI), centros fibrilares heterogéneos (CFhet), centros fibrilares homogéneos (CFhom), componente fibrilar denso (CFD), citoplasma (CT) y vacuolas (V). Se obtuvo una distribución del marcado similar en ambos casos. La mayor densidad de partículas de oro se encontró en las masas de cromatina condensada, de cinco a seis veces superior a la obtenida sobre la región intercromatínica. En el nucleolo la densidad descende desde los centros fibrilares heterogéneos al componente fibrilar denso, siendo intermedia en los centros fibrilares homogéneos. El marcado en el citoplasma fue superior al encontrado en las vacuolas citoplásmicas cuya densidad se utilizó para estimar el ruido de fondo.

#### **4.1.2. Detección de histonas mediante inmunomarcado y tinción de los cortes con NAMA-Ur**

La combinación de inmunomarcado con anti-histonas y tinción de los cortes con NAMA-Ur permitió localizar las partículas de oro sobre las estructuras contrastadas.

El marcado se localizó en la cromatina condensada (CR) y algunas fibras de DNA teñidas de la región intercromatínica (flechas) (Fig. 24), si bien resultó ser menos intenso que el obtenido tras inmunodetección de histonas en cortes ultrafinos de muestras tratadas con la técnica de metilación-acetilación.

#### **4.2. Localización ultraestructural de DNA**

##### **4.2.1. Inmunomarcado sobre cortes de muestras tratadas con la citoquímica MA**

Las partículas de oro se localizaron sobre las masas de cromatina condensada (CR) (Figs. 22 y 23), siendo el marcado en estas zonas muy intenso y con frecuencia sigue estructuras fibrilares. En la región intercromatínica (RI) se observaron algunas fibras marcadas (flechas).

En el nucleolo (NU), el marcado más intenso se encontró sobre las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha) (Fig. 22). Los centros fibrilares homogéneos (doble flecha), principalmente en su periferia, y ciertas zonas del componente fibrilar denso (flechas abiertas) también se marcaron.

La representación gráfica de la densidad de partículas de oro en distintos compartimentos celulares (Fig. 29) resultó ser semejante a la distribución del marcado con anti-histonas.

##### **4.2.2. Detección de DNA mediante inmunomarcado y tinción de los cortes con NAMA-Ur**

Al combinar la técnica NAMA-Ur, realizada sobre cortes ultrafinos, con inmunodetección de DNA se encontró el marcado con oro sobre las estructuras específicamente teñidas (Fig. 26).

Las partículas de oro se concentran sobre las masas de cromatina condensada (CR), contrastadas por la técnica NAMA-Ur (Fig. 26). También se observan algunos granos de oro sobre fibras de la región intercromatínica (RI), específicamente teñidas (flechas).

El nucleolo (NU) aparece claro a los electrones a excepción de las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha), en los cuales se localiza el inmunomarcado así como en regiones menos contrastadas del interior nucleolar (flechas abiertas). Ocasionalmente se encuentran masas de cromatina condensada en contacto con el nucleolo, que también presentan marcado (flecha gruesa).

El marcado es menos intenso que el obtenido tras inmunodetección de DNA en cortes ultrafinos de muestras tratadas con la técnica de metilación-acetilación.

La técnica NAMA-Ur tiñe a nivel de microscopía electrónica las mismas estructuras a las que se une el DAPI (Fig. 25), utilizado en microscopía de fluorescencia.

#### **4.3. Localización ultraestructural simultánea de DNA e histonas en combinación con la citoquímica MA**

Se encontraron sobre las mismas estructuras nucleares partículas de oro de 10 y 15 nm, que revelan respectivamente histona H4 y DNA (Fig. 21).

En las masas de cromatina condensada (CR) se concentró principalmente el marcado. En masas de cromatina condensada del interior del nucleolo (cabeza de flecha) se detectaron histonas y DNA. En el resto del nucleolo el marcado se localizó en regiones del componente fibrilar denso (F) y centros fibrilares.

La intensidad del marcado fue inferior a la obtenida cuando ambos anticuerpos se utilizaron por separado.

## 5. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS LUGARES DE REPLICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CÉLULAS EN FASE S

### 5.1. Inmunomarcado con oro después de incorporación *in vivo* de BrdU

Las raíces de cebolla germinadas se incubaron durante 1 hora con una solución que contenía BrdU, el cual se incorpora al DNA en lugar de dT y por lo tanto permite localizar el DNA replicado e identificar células en fase S. Posteriormente las raíces se lavaron, fijaron y trataron con la técnica de metilación-acetilación antes de su inclusión en Lowicryl K4M.

Los cortes ultrafinos se incubaron con anticuerpos anti-BrdU que se revelaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro.

El marcado (flechas) se localizó en algunas fibras de la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR) (Figs. 30 y 31). En el resto de las estructuras nucleares no se encontraron partículas de oro.

### 5.2. Inmunolocalización ultraestructural de PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa  $\delta$ . Se utilizaron anticuerpos anti-PCNA como alternativa a la incorporación *in vivo* de BrdU para marcar células en fase S. Los estudios se llevaron a cabo sobre cortes ultrafinos de meristemos radiculares de raíz de cebolla que contenían células en diferentes momentos del ciclo celular.

En células meristemáticas de raíz de cebolla durante mitosis (Figs. 32 a 35) no se encontró marcado significativo después de inmunodetección de PCNA.

En células en G1 (Figs. 36 y 37), reconocidas por la típica forma lobulada que presenta el núcleo en esta fase (Fig. 36), el marcado (flechas) fue muy escaso (Fig. 37). Ocasionalmente se encontraron partículas de oro en fibras de la periferia de las masas de cromatina condensada (CR).

Se encontró otro tipo de células interfásicas, de mayor tamaño que las células en fase G1 cuyos núcleos tenían forma elíptica y la cromatina más descondensada (Fig. 38). En ellas el inmunomarcado con anti-PCNA fue positivo y su distribución

semejante a la obtenida tras incorporación *in vivo* de BrdU e inmunomarcado con oro. El marcado (flechas) se encontró en forma de partículas de oro aisladas y dispersas en el nucleoplasma y como pequeñas agrupaciones sobre fibras de la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR) (Figs. 39 y 40). Estos datos permitieron determinar que esas células se encontraban en fase S.

Se realizó la doble inmunolocalización de DNA y PCNA y se encontró que en células en fase S el PCNA colocalizaba con DNA en los mismos lugares en los que se encontraba el marcado con anti-PCNA (Figs. 41 y 42). Se observaron fibras (flechas abiertas) en la periferia de las masas de cromatina condensada y región intercromatínica que presentaban partículas de oro de los dos tamaños.

## 6. DETERMINACIÓN DE DISTINTAS FASES DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN DE PIMIENTO

La tinción con DAPI de cortes semifinos de anteras permitió identificar diferentes momentos del desarrollo del polen. Si bien el desarrollo gametofítico del polen no es totalmente sincrónico, en anteras de tamaño diferente se encontraron granos de polen en diferentes momentos de su evolución, desde la fase de tetrada hasta la de bicelular. Nuestro interés se centró principalmente en los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular joven puesto que en estas fases es posible la reprogramación del polen hacia embriogénesis. Los núcleos de las microsporas vacuoladas (Fig. 43) están desplazados lateralmente y la tinción con DAPI reveló diferentes estados de condensación de la cromatina en función de la intensidad de fluorescencia, que corresponden a diferentes momentos de la evolución de la microspora vacuolada. Durante profase (Fig. 54) se observa una mayor condensación de la cromatina. En el grano de polen bicelular (Figs. 43 y 44) los núcleos vegetativo (flecha larga) y generativo (flecha corta) presentan un diferente patrón de cromatina. El núcleo generativo presenta una mayor intensidad de fluorescencia.

La observación bajo contraste de fase de cortes semifinos de anteras tratadas con la técnica de metilación-acetilación (MA), permitió apreciar los cambios celulares que tienen lugar durante la evolución del polen desde la fase de microspora vacuolada a la de bicelular joven. El estadio de microspora vacuolada (Figs. 45-51) es muy dinámico y en él se producen cambios en el patrón de condensación de la cromatina acompañados de cambios en la forma del núcleo que van desde redondeada en fases tempranas a elíptica en estadios próximos a la mitosis. El

núcleo ocupa una posición lateral debido a la presencia de una gran vacuola citoplásmica, creándose una polaridad que condiciona su desarrollo posterior, dando lugar a una mitosis asimétrica. En fases próximas a la mitosis la gran vacuola central comienza a fragmentarse dando lugar a la aparición de pequeñas vacuolas. Durante profase (Figs. 52, 53 y 55) se observa la condensación de la cromatina. El nucleolo se reabsorbe al final de profase y en metafase los cromosomas alcanzan la máxima condensación a la vez que se disponen en la placa ecuatorial, situada entre la pared de la microspora y el tonoplasto (Fig. 56). Una vez completadas las etapas de anafase (Fig. 57) y telofase (Fig. 58) se forma el grano de polen bicelular (Figs. 59-64) que está constituido por dos células, la vegetativa (flecha larga) de mayor tamaño y la generativa (flecha corta), más pequeña e incluida en el citoplasma de la anterior. Inicialmente la célula generativa está pegada a la pared del polen. En esta fase los núcleos vegetativo y generativo están próximos y presentan un patrón de condensación de la cromatina semejante, en el que se aprecian pequeñas masas de cromatina condensada. A medida que prosigue la evolución del grano de polen bicelular, la célula generativa se desplaza hacia posiciones más centradas, separándose de la pared y mantiene su patrón de cromatina condensada, mientras que en el núcleo vegetativo la cromatina comienza a descondensarse. Estas diferencias en cuanto al grado de condensación de la cromatina se acentúan a medida que el polen avanza hacia la fase de bicelular intermedio, en la que además se reabsorbe la vacuola.

## 7. CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL GRANO DE POLEN

Para apreciar en detalle los cambios ultraestructurales que ocurren durante la interfase de la microspora y polen bicelular fue necesario disponer de muestras tratadas con el método de metilación-acetilación para estudiar la estructura fina del núcleo y la distinta organización de los compartimentos nucleares en relación a los estados de actividad. Se realizó un estudio secuencial a lo largo del desarrollo gametofítico hasta la fase de bicelular joven, para caracterizar diferentes estadios como paso previo para poder determinar los cambios que tienen lugar cuando el polen se reprograma hacia embriogénesis.

En la fase de tetrada, las cuatro microsporas jóvenes permanecen juntas envueltas por una cubierta de calosa (Fig. 65). En estas microsporas el núcleo ocupa una posición central (Fig. 66). Existen dos patrones de cromatina resultado del

proceso de descondensación que tiene lugar desde el comienzo de la fase de tetrada. Se observan grandes masas de cromatina condensada, principalmente en contacto con la envoltura nuclear, que coexisten con otras más pequeñas, dejando entre si grandes espacios en la región intercromatínica ocupados por gránulos y fibras. El nucleolo se encuentra en fase de reactivación y está constituido mayoritariamente por componente fibrilar denso en cuyo interior aparece una gran vacuola de reactivación (VR) que contiene gránulos pericromatínicos nucleolares (ver detalle en Fig. 80). Esta morfología nucleolar se sigue observando en estadios tempranos de la fase de microspora vacuolada (Fig. 68). El citoplasma es rico en orgánulos y vacuolas de pequeño tamaño.

Posteriormente las microsporas pasan por estadios intermedios durante los cuales las pequeñas vacuolas citoplásmicas se funden. De este modo se forma la microspora vacuolada (Figs. 67-72) que se caracteriza por la presencia de una gran vacuola (V) ocupando la mayor parte del volumen citoplásmico, que desplaza el núcleo a una posición lateral. Esta fase es muy dinámica y en ella se producen cambios en el estado de actividad y la forma del núcleo.

En estadios tempranos de la fase de microspora vacuolada el núcleo es redondeado (Figs. 67-69). Se observan numerosas y pequeñas masas de cromatina condensada distribuidas irregularmente con tendencia a estar próximas a la periferia, en contacto con la envoltura nuclear, y algunas discretas en el interior. La región intercromatínica es densa. El nucleolo se activa, pasando de una morfología en la que predomina una gran vacuola de reactivación (Fig. 68), a otra en la que el componente granular se entremezcla con el fibrilar denso y aparecen numerosos centros fibrilares homogéneos (Fig. 69; ver aumento en Fig. 83).

El estado de actividad del nucleolo se mantiene cuando la forma del núcleo pasa a ser elíptica (Figs. 70-72), observándose la presencia de vacuolas de actividad (Fig. 70; ver detalle de un nucleolo en un estadio semejante en Fig. 103), asociadas al componente granular y que contienen partículas prerribosómicas. El patrón de condensación de la cromatina cambia hacia formas más descondensadas que en estadios anteriores (Comparar Figs. 67-69 con Fig. 71; ver ampliación de estos estadios en Figs. 81-83 y Fig. 85, respectivamente). Las masas de cromatina condensada son menos numerosas y se localizan principalmente en la periferia del núcleo (Figs. 70 y 71). A medida que la microspora se acerca a profase, la cromatina se vuelve a condensar (Fig. 72). En los estadios finales de la interfase de la

microspora, el citoplasma se reduce, ocupando una fina capa entre la vacuola y la pared de la microspora. Se observan depósitos densos en el interior de las vacuolas citoplásmicas.

Después de la mitosis asimétrica de la microspora se forma el grano de polen bicelular, constituido por dos células: la vegetativa, de mayor tamaño, y la generativa, más pequeña e incluida en el citoplasma de la anterior. En el polen bicelular recién formado el patrón de condensación de la cromatina es semejante en las dos células (Fig. 73 y 123). En estadios posteriores (Figs. 74-78), la cromatina del núcleo vegetativo se descondensa mientras que la del generativo se mantiene en estado condensado.

El nucleolo (NU) vegetativo (Figs. 74 a 78) se activa en los primeros estadios de la fase de polen bicelular joven. En estadios muy activos (Fig. 78) el componente granular (G) es abundante y aparece entremezclado con el fibrilar denso (F). Se observa una vacuola de actividad (VA) (Fig. 78), con partículas prribosómicas en su interior. Los centros fibrilares son de tipo homogéneo. Aparecen cuerpos nucleares densos próximos al nucleolo (flecha gruesa), de aspecto fibrilar (Figs. 76 y 78).

El nucleolo generativo (Figs. 73, 75 y 76) no llega a alcanzar el estado de actividad del vegetativo y se mantiene, en estos estadios, poco activo. Se compone principalmente de componente fibrilar denso agrupado alrededor de la región organizadora del nucleolo (NOR) que forma un gran centro fibrilar heterogéneo dentro del mismo (flecha curva). En la periferia se observa una fina capa de material granular.

Las vacuolas citoplásmicas se reabsorben en la fase de polen bicelular y en su interior se siguen observando depósitos densos a los electrones (Fig. 89), al igual que en otras fases del desarrollo gametofítico.

## **8. LOCALIZACIÓN DE LOS PERIODOS DE REPLICACIÓN DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN**

La incorporación *in vivo* de BrdU para identificar células en fase S y estudiar los periodos de replicación resultaba ser un abordaje muy complicado en este material por lo que se utilizaron otros marcadores alternativos. Los resultados obtenidos mediante inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz

de cebolla en diferentes fases del ciclo celular nos impulsaron a usar este anticuerpo para estudiar la dinámica de la fase S en microsporas y polen bicelular joven de pimiento.

El PCNA se localizó en estadios tempranos del desarrollo de la microspora, concretamente hacia el final de la fase de tetrada en la que comienza a disolverse la pared de calosa (Figs. 79 y 80). Se observaron pequeños grupos de 3 o más partículas de oro en fibras de la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR), que en esta fase son de gran tamaño. Asimismo se encontró un marcado disperso en el nucleoplasma y el componente fibrilar denso del nucleolo (NU) (Fig. 80).

El patrón de marcado de los anticuerpos anti-PCNA en distintos momentos del desarrollo de la microspora vacuolada (Figs. 81 a 86) fue diferente. En estadios tempranos, en los que la forma del núcleo es redondeada, el marcado agrupado se localizó en fibras de cromatina descondensada de la región intercromatínica y periferia de masas de cromatina condensada (Figs. 81, 82 y 83, correspondientes a los estadios mostrados en las Figs. 67, 68 y 69, respectivamente). La intensidad del marcado fue inferior a la que se obtuvo en la fase de tetrada.

En una etapa posterior, que coincide con el cambio de forma del núcleo de redondeada a elíptica y la cromatina está más descondensada, el marcado con anti-PCNA es escaso y principalmente aparece en forma dispersa, si bien también se observan algunas fibras de la región intercromatínica marcadas por pequeños grupos de partículas de oro (Fig. 84, correspondiente al estadio mostrado en la Fig. 70). Al final de esta etapa el marcado vuelve a ser intenso y está principalmente asociado a las masas de cromatina condensada en contacto con la envoltura nuclear (Fig. 85, correspondiente al estadio mostrado en la Fig. 71).

Finalmente la cromatina vuelve a condensarse al final de la interfase de la microspora, próxima a entrar en profase. La región intercromatínica presenta menos estructuras que en fases anteriores en las que la cromatina estaba más dispersa (comparar Figs. 85 y 86). En este estadio el marcado es muy escaso y está disperso en el nucleoplasma (Fig. 86, correspondiente al estadio mostrado en la Fig. 72).

En el polen bicelular joven se encuentran diferencias en el patrón de cromatina y estado de actividad del nucleolo entre las células vegetativa y generativa

(Figs. 89 y 92). Sin embargo la intensidad y distribución del marcado con anti-PCNA es semejante en ambos núcleos, en forma de partículas de oro aisladas en el nucleoplasma (Figs. 87 y 88; 90 y 91).

En estadios posteriores, en los que la célula generativa comienza a desplazarse hacia el centro del grano de polen, separándose de la pared (Fig. 95), la localización y distribución del marcado con anticuerpos anti-PCNA es distinta en los núcleos vegetativo y generativo (Figs. 93 y 94). El núcleo vegetativo presenta un marcado similar al descrito anteriormente (Fig. 93), mientras que el generativo entra en fase S. Las partículas de oro están agrupadas sobre fibras de la región intercromatínica y periferia de las masas de cromatina condensada (Fig. 94). Este marcado coexiste con otro disperso en el nucleoplasma.

La evaluación cuantitativa del marcado reveló una distribución diferente en microsporas vacuoladas (Fig. 96 ) y células vegetativa (Fig. 97) y generativa (Fig. 98) de polen bicelular joven. En las microsporas vacuoladas el marcado disperso (1 o 2 partículas de oro) representó el 5% del área total medida. En las células vegetativa y generativa este valor fue de un 4%. El marcado agrupado (3 o más partículas de oro) fue un 2% en microsporas vacuoladas y un 0% y 0.18% en células vegetativa y generativa, respectivamente.

## 9. INMUNOLocalización ULTRAESTRUCTURAL DE HÍBRIDOS DNA/RNA

Para estudiar la actividad transcripcional nucleolar y extranucleolar en diferentes fases del desarrollo del polen, se utilizaron anticuerpos que reconocen híbridos DNA/RNA. Las muestras se trataron con el método de metilación-acetilación antes de su inclusión en la resina Lowicryl K4M.

La localización de los híbridos DNA/RNA nos ayudó a determinar las estructuras en las que tiene lugar la transcripción.

### 9.1. Estudio de la transcripción nucleolar

En microsporas jóvenes en la fase de tetrada se encontró un marcado escaso en el componente fibrilar denso (F) del nucleolo (NU), que se encuentra en reactivación (Fig. 99).

En microsporas vacuoladas la intensidad del marcado sobre el nucleolo fue diferente, dependiendo de su estado de actividad. En nucleolos poco activos, con algunos centros fibrilares de tipo homogéneo (doble flecha) y componente granular (G) todavía situado en la periferia, el marcado no fue abundante y se localizó en el componente fibrilar denso y periferia de algunos centros fibrilares homogéneos (Fig. 101). En nucleolos muy activos, se matuvo este patrón de marcado si bien su intensidad fue mayor (Fig. 103). Las vacuolas de actividad (VA) y componente granular están prácticamente libres de partículas de oro.

En el polen bicelular joven se observaron diferencias en el estado de actividad entre los nucleolos generativo (Fig. 105) y vegetativo (Fig. 107). El generativo se encuentra en un estado temprano de actividad. Está formado por componente fibrilar denso, centros fibrilares homogéneos, un gran centro fibrilar heterogéneo en la zona de entrada del NOR y una fina capa de componente granular en la periferia. El marcado se concentra en el componente fibrilar denso, ocasionalmente, en la periferia de los centros fibrilares (Fig. 105). El nucleolo vegetativo es más activo. El componente granular es abundante y se entremezcla con el fibrilar denso, estableciendo contacto con las vacuolas de actividad. Las partículas de oro que localizan los híbridos DNA/RNA en el nucleolo se observaron en el componente fibrilar denso; algunos centros fibrilares homogéneos están marcados en la periferia (Fig. 107).

## **9.2. Estudio de la transcripción extranucleolar**

En la fase de tetrada los lugares de transcripción extranucleolares se localizaron en fibras de la región intercromatínica (RI) (Figs. 99 y 100). El marcado fue abundante y específicamente concentrado en esas estructuras. No se encontraron partículas de oro sobre las masas de cromatina condensada (CR).

En microsporas vacuoladas la región intercromatínica es rica en gránulos y fibras. El marcado se localizó exclusivamente sobre estas últimas (Figs. 102 y 104) aunque su abundancia fue menor que en la fase de tetrada. No se encontraron partículas de oro sobre las masas de cromatina condensada.

En granos de polen bicelulares jóvenes la transcripción extranucleolar se localizó en fibras de la región intercromatínica en los núcleos generativo (Fig. 106) y vegetativo (Fig. 108).

## 10. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE FIBRAS DE DNA EN LA REGIÓN INTERCROMATÍNICA MEDIANTE LA REACCIÓN DE TdT

Este método se basa en la incorporación de 5-bromo-deoxi-uridina-trifosfato (BrUTP) en los extremos hidroxilo 3' libres de DNA expuestos en la superficie de los cortes ultrafinos, mediante una reacción catalizada por la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT). Los nucleótidos marcados incorporados a las cadenas de DNA se revelaron con anticuerpos anti-BrdU.

Esta es una técnica muy sensible capaz de detectar pequeñas cantidades de DNA, que se utilizó para estudiar el patrón de cromatina en microsporas vacuoladas y polen bicelular en combinación con la citoquímica MA y, en particular, la presencia de fibras de cromatina descondensada en la región intercromatínica. La inmunolocalización de PCNA e híbridos DNA/RNA en fibras de la región intercromatínica nos llevó a la aplicación *in situ* de la reacción de TdT para buscar fibras de DNA que podrían estar activas y/o preparadas para replicación y/o transcripción.

En determinados estadios de la fase de microspora vacuolada (Fig. 109) y células vegetativas (Fig. 110) la cromatina está dispersa. El marcado se localizó en las pequeñas masas de cromatina condensada y en abundantes fibras de cromatina descondensada de la región intercromatínica. El núcleo generativo presenta un patrón de cromatina diferente (Fig. 111). Las masas de cromatina condensada son más grandes y en ellas se concentra mayoritariamente el marcado. En algunas fibras de la región intercromatínica también se localizó DNA.

Este método también localizó DNA en los centros fibrilares (doble flecha) y componente fibrilar denso del nucleolo.

## 11. INMUNOLocalización ULTRAESTRUCTURAL DE LOS snRNPs

Con objeto de localizar los factores implicados en el "splicing" de los RNA mensajeros, se empleó el anticuerpo 7.13 que reconoce la proteína D común a los snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5.

La inmunolocalización se llevó a cabo en cortes ultrafinos de granos de polen, procedentes de muestras tratadas con el método de metilación-acetilación.

Las partículas de oro se localizaron en fibras de la región intercromatínica (RI), las mismas estructuras que presentan marcado con anticuerpos anti-híbridos DNA/RNA, aunque es menos abundante (Figs. 112 y 113). Los gránulos intercromatínicos no están marcados.

El marcado anti-snRNPs también se combinó con la técnica citoquímica EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas (Figs. 113 a y b). Las partículas de oro se localizaron sobre fibras teñidas de la RI localizadas en distintas posiciones en relación a las áreas blanqueadas por la tinción, en las que tradicionalmente se asume que se localiza la cromatina condensada (Bernhard, 1969; Puvion y col., 1984). En ningún caso se observó marcado sobre gránulos.

## 12. INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL FACTOR UBF

Se utilizó el anticuerpo anti-NOR90 para localizar el factor UBF, asociado a la RNA polimerasa I, la enzima que lleva a cabo la transcripción del RNA ribosómico.

Este anticuerpo se ensayó en diferentes estadios del desarrollo del polen. La inmunodetección se llevó a cabo en cortes de muestras tratadas con el método de metilación-acetilación.

En los nucleolos en reactivación de las microsporas en fase de tetrada, el marcado con anti-NOR90 fue escaso. Las partículas de oro se localizaron específicamente en el componente fibrilar denso (Figs. 114 y 115), del que mayoritariamente se componen estos nucleolos. Los cuerpos nucleares (cabeza de flecha), que aparecen en esta fase, también se marcaron (Fig. 114).

En nucleolos activos de microsporas vacuoladas (Figs. 116 y 117) el marcado fue más intenso que en nucleolos en reactivación. En nucleolos muy activos (Fig. 117), con una gran vacuola de actividad, se encontró un marcado intenso específicamente concentrado en regiones discretas del componente fibrilar denso.

En estadios muy tempranos del desarrollo del polen bicelular, cuando el nucleolo vegetativo (Fig. 118) comienza a activarse y el generativo (Fig. 119) aún

está inactivo, se observan diferencias de marcado. Escasas partículas de oro se localizan en el componente fibrilar denso del nucleolo vegetativo (Fig. 118). El marcado es prácticamente inexistente en el nucleolo generativo (Fig. 119) formado casi exclusivamente por componente fibrilar denso.

### **13. LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL SIMULTÁNEA DE HÍBRIDOS DNA/RNA Y EL FACTOR UBF**

Los experimentos de doble inmunomarcado para localizar simultáneamente híbridos DNA/RNA y el factor UBF se realizaron sobre cortes ultrafinos de granos de polen tratados con el método de metilación-acetilación.

Las partículas de oro de 5 (flechas cortas) y 10 nm (flechas largas) que revelan respectivamente híbridos DNA/RNA y el factor UBF, se localizaron en el componente fibrilar denso del nucleolo. La intensidad del marcado se correlacionó con el estado de actividad del nucleolo. En nucleolos activos (Figs. 120 y 121) se observaron abundantes partículas de oro de ambos tamaños distribuidas en el componente fibrilar denso, a menudo en las proximidades de los centros fibrilares homogéneos (doble flecha). En algunas regiones del componente fibrilar denso colocan partículas de oro de 5 y 10 nm. El marcado que reconoce los híbridos DNA/RNA fue más intenso que el del factor UBF, como ocurre cuando se realiza la inmunodetección simple de ambos antígenos.

Los híbridos DNA/RNA también se localizaron en fibras de cromatina descondensada de la región intercromatínica.

### **14. INMUNOLocalización ULTRAESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA FIBRILARINA**

Se utilizó el anticuerpo B-36 que reconoce la proteína fibrilarina, la cual participa en el proceso de maduración de los transcritos ribosómicos.

Los ensayos se realizaron sobre cortes de granos de polen en distintos estadios de su desarrollo, de muestras tratadas con la citoquímica MA, para estudiar los posibles cambios en la distribución y/o abundancia de esta proteína en relación a la actividad nucleolar.

En los diferentes estadios estudiados el patrón de marcado fue semejante. El inmunomarcado con oro que localiza este antígeno se encontró exclusivamente en el componente fibrilar denso del nucleolo (Figs. 122, 124 y 125). En ningún caso se observaron partículas de oro sobre los centros fibrilares o componente granular, ni sobre otras estructuras nucleares.

La intensidad del marcado parece no estar relacionada con la actividad del nucleolo. En microsporas vacuoladas (Fig. 122), células generativas (Fig. 124) y vegetativas (Fig. 125) de granos de polen bicelulares jóvenes (Fig. 123), cuya ultraestructura refleja una diferente tasa de síntesis de ribosomas, la intensidad del marcado fue similar.

## 15. INMUNOLocalización ULTRAESTRUCTURAL DE RNA

Para estudiar la composición de RNA en los distintos compartimentos nucleares a lo largo del desarrollo del grano de polen, se utilizaron anticuerpos anti-RNA. La combinación de la inmunodetección de RNA con la citoquímica MA permitió una correcta asignación del marcado con oro.

En estadios finales del desarrollo de la microspora vacuolada el nucleolo comienza a desactivarse por lo que presenta una estructura segregada (Figs. 126 y 127). Está principalmente formado por componente fibrilar denso, con algún centro fibrilar homogéneo en su interior, rodeado por componente granular. Las partículas de oro que revelan RNA están irregularmente distribuidas en el nucleolo. El componente fibrilar denso se marca moderadamente con anticuerpos anti-RNA, mientras que el marcado sobre el componente granular es abundante (Figs. 126 y 127). La intensidad del marcado desciende a medida que la actividad nucleolar decae, como ocurre cuando la microspora se acerca a profase (comparar las Figs. 126 y 127).

En el polen bicelular joven se observan diferencias de actividad entre los nucleolos generativo (Fig. 128) y vegetativo (Fig. 129). El nucleolo generativo es poco activo y se compone de componente fibrilar denso, en cuyo interior se reconocen algunos centros fibrilares homogéneos y componente granular situado en la periferia (Fig. 128). En cambio el nucleolo vegetativo es más activo. El componente granular es más abundante y se mezcla con el fibrilar denso (Fig. 129). El marcado es moderado en el componente fibrilar denso y abundante en el granular (Figs. 128 y

129). En ocasiones se observan cuerpos nucleares (flecha), de aspecto fibrilar, que también se marcan con anticuerpos anti-RNA (Fig. 128).

En diferentes momentos del desarrollo gametofítico del polen se observa marcado en fibras en la región intercromatínica (RI) (Figs. 126 a 129).

El citoplasma se marca intensamente (Fig. 127) mientras que las vacuolas citoplásmicas (V) y masas de cromatina condensada (CR) están libres de partículas de oro.

La inmunolocalización de RNA también se llevó a cabo en cortes teñidos con EDTA (Fig 113c) o sobre cortes de muestras tratadas con MA y digeridos con DNasa (Fig. 113d). Aunque los tratamientos citoquímicos empleados son diferentes, el resultado es semejante. En ambos casos se contrastan preferencialmente estructuras que contienen RNA: nucleolo, región intercromatínica y citoplasma. Nuestro interés se centró principalmente en el marcado sobre estructuras de la región intercromatínica para completar el estudio de la organización funcional de este compartimento nuclear. Las partículas de oro se localizaron sobre fibras contrastadas por los métodos citoquímicos utilizados, pero no sobre gránulos. El marcado fue específico pero poco intenso en comparación con el marcado que proporcionan anticuerpos anti-snRNPs (comparar las figs. 113 a y b con las figs. 113c y d).

## **16. LOCALIZACIÓN DE TRANSCRITOS RIBOSÓMICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* RNA/RNA**

### **16.1. Hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal**

El RNA ribosómico se localizó en células meristemáticas de raíces de cebolla en diferentes estados de actividad, utilizando sondas marcadas con digoxigenina correspondientes a las secuencias 18S y 25S de *Raphanus sativus* L. y *Arabidopsis thaliana* L., respectivamente. El revelado de los híbridos formados se realizó con anticuerpos conjugados con fluoresceína y las preparaciones se observaron en un microscopio confocal equipado con un detector láser. La microscopía confocal nos permitió utilizar secciones gruesas y obtener imágenes de planos focales sucesivos, que una vez proyectadas una sobre otra proporcionaron información sobre la distribución del marcado en nucleolos enteros. El patrón de marcado fue similar con las dos sondas utilizadas.

Se detectó la presencia de transcritos ribosómicos en el nucleolo (NU) y citoplasma (CT). En el nucleolo se encontró la mayor intensidad de marcado, cuya distribución fue irregular. La señal de fluorescencia más elevada se encontró en zonas del interior y periferia del nucleolo (Figs. 130, 131, 132 y 133) entremezcladas con zonas de intensidad de fluorescencia intermedia.

Se realizó tratamiento de imagen para transformar la escala de grises que indica la intensidad de fluorescencia, en una escala de color. Este tratamiento nos permitió apreciar mejor la distinta distribución de RNA en el nucleolo, asignando distintos colores a los distintos niveles de fluorescencia (Figs. 131 y 133).

## 16.2. Hibridación *in situ* a nivel de microscopía electrónica

El RNA ribosómico se localizó ultraestructuralmente en células meristemáticas de raíces de cebolla brotadas (Fig. 134) y no brotadas (Fig. 135), así como en granos de polen de pimiento en diferentes momentos de su desarrollo gametofítico (Figs. 136 a 139), en combinación con la citoquímica MA. Se empleó la sonda correspondiente a la secuencia 25S de *Arabidopsis thaliana* L., marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro.

En todos los tipos celulares estudiados se encontró un patrón de marcado similar. Las partículas de oro se localizaron en el nucleolo (NU), citoplasma (CT) y región intercromatínica (RI). El componente granular (G) del nucleolo fue la estructura en la que se observó la mayor intensidad de marcado (Figs. 134 a 139). Las vacuolas de actividad (VA) (Figs. 136, 137 y 138), que aparecen en nucleolos activos y están en conexión con el componente granular también se marcaron pero menos intensamente. El componente fibrilar denso (F) se marcó moderadamente, así como los centros fibrilares homogéneos (doble flecha) en su periferia (Figs. 134 a 139), en los que ocasionalmente se apreciaron granos de oro sobre fibras de RNA ribosómico penetrando hacia su interior (Fig. 137). En la región intercromatínica se encontró un marcado diferencial que fue mayor en células reproductoras que en células somáticas (comparar Figs. 134 y 135 con Figs. 136 a 139). Las regiones ricas en ribosomas del citoplasma se marcaron abundantemente (Figs. 135 y 136).

La ultraestructura nucleolar cambia drásticamente en relación a la tasa de síntesis de ribosomas. En células proliferantes activas en transcripción ribosómica de

meristemas de raíz de cebolla (Fig. 134), el componente granular es abundante y aparece asociado con vacuolas de actividad en el interior nucleolar. Predominan los centros fibrilares de tipo homogéneo. En cambio, los nucleolos inactivos de meristemas de raíces no brotadas de cebolla (Fig. 135) están principalmente formados por componente fibrilar denso. El patrón de distribución del componente granular cambia en relación al estado de actividad nucleolar y con él la distribución del marcado con oro. El componente granular es escaso en este tipo de nucleolos y se localiza exclusivamente en la periferia. Se observan masas de cromatina condensada en estrecho contacto con el nucleolo (flecha gruesa) que probablemente representan la cromatina ribosómica inactiva.

En microporas vacuoladas tardías, el nucleolo es activo (Figs. 136 y 137) y su ultraestructura es semejante a la de los nucleolos activos en transcripción de las células proliferantes de raíz de cebolla. La intensidad y distribución del marcado con oro que localiza los transcritos ribosómicos también fue similar. El estado de actividad del nucleolo se mantiene cuando el patrón de cromatina cambia desde estados más condensados (Fig. 136) a más dispersos (Fig. 137), al final de la interfase de la microspora. Se encontraron diferencias en la localización de RNA ribosómico en la región intercromatínica entre estos dos estadios (comparar Figs. 136 y 137). La célula generativa (Fig. 139) del polen bicelular presentó un marcado más intenso en la región intercromatínica que la vegetativa (Fig. 138). Entre ambos núcleos también se encontraron diferencias en el patrón de cromatina. La cromatina está más dispersa en el núcleo vegetativo que en el generativo. El estado de actividad de los nucleolos es diferente; el nucleolo vegetativo es más activo, con una vacuola de actividad en su interior, que el generativo, que muestra una estructura segregada, con el componente granular rodeando al fibrilar denso (comparar Figs. 138 y 139).

## 17. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* RNA/DNA

### 17.1. Hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal

El DNA ribosómico se localizó en células meristemáticas de raíces de cebolla en diferentes estados de actividad, utilizando una sonda marcada con digoxigenina correspondiente a la secuencia 25S de *Arabidopsis thaliana* L. El revelado de los híbridos formados se realizó con anticuerpos conjugados con fluoresceína y las preparaciones se observaron en un microscopio confocal equipado con un detector

láser. La microscopía confocal nos permitió utilizar secciones gruesas y obtener imágenes de planos focales a distintos niveles de un mismo nucleolo (Figs. 140 a 145) o proyecciones de cortes ópticos sucesivos (Figs. 146 y 147). Se realizó tratamiento de imagen para asignar falso color y poder determinar con más detalle el estado funcional de la cromatina ribosómica.

Se observó una distintinta organización del DNA ribosómico en nucleolos activos (Figs. 140 a 146) y poco activos (Fig. 147). En el interior nucleolar se observaron amplias zonas con una baja señal, revelada por el color azul (ver escala de intensidad de fluorescencia) y otras zonas más discretas que presentaban una *intensidad de fluorescencia intermedia, en color verde*. En la *periferia nucleolar* y en contacto con la señal del nucleolo, se encontraron masas de aspecto circular, en número máximo de cuatro, en las que se concentró el marcado más intenso, coloreadas *principalmente en rojo*. En los nucleolos poco activos (Fig. 147) se observaron áreas que presentaban una intensidad de fluorescencia semejante a la de las masas perinucleolares.

## **17.2. Hibridación *in situ* a nivel de microscopía electrónica**

---

El DNA ribosómico se localizó ultraestructuralmente en células meristemáticas de raíces de cebolla no brotadas (Figs. 148 y 149) y brotadas (Figs. 150 y 151), en combinación con la citoquímica MA. Se empleó la sonda correspondiente a la secuencia 25S de *Arabidopsis thaliana* L., marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro.

El marcado se localizó en el componente fibrilar denso y centros fibrilares del nucleolo (Figs. 148 a 151), mientras que no se encontraron partículas de oro sobre el componente granular.

En raíces no brotadas el nucleolo es inactivo y presenta una típica forma segregada (Figs. 148 y 149), con el componente granular rodeando al fibrilar denso. Se observan masas de cromatina condensada en contacto con el nucleolo, donde se encontraron partículas de oro.

## 18. CULTIVO *IN VITRO* DE POLEN AISLADO EN MEDIO LÍQUIDO

El abordaje detallado en los capítulos precedentes nos ha permitido estudiar el programa de desarrollo gametofítico del polen de pimiento. Esto fue necesario para determinar el estado fisiológico de la fase más adecuada para reprogramarse hacia embriogénesis. Se probaron diferentes medios de cultivo y se partió de distintas fases de desarrollo.

### 18.1. Condiciones de los cultivos para la inducción de embriogénesis

Se ensayaron diferentes composiciones de medios de cultivo para la inducción de embriogénesis. Los mejores resultados se obtuvieron en condiciones de cultivo de semiayuno, es decir, utilizando medios de cultivo con sales y una baja concentración (40 mM) de sacarosa a 25°C.

### 18.2. Seguimiento de los cultivos. Tinción con DAPI

La tinción con DAPI permitió observar la progresión de los cultivos. Se realizaron controles en el momento de la puesta en cultivo para determinar la fase del desarrollo gametofítico del grano de polen de la que se partía. La población inicial no era totalmente homogénea y se componía principalmente de microsporas vacuoladas (Figs. 152 y 153). También se encontraron algunos granos bicelulares jóvenes coexistiendo con las microsporas. A los dos días de iniciado el cultivo se encontraron granos de polen bicelulares atípicos que presentaban dos núcleos con el mismo estado de condensación de la cromatina (Fig. 154). A partir del décimo día se encontraron granos de polen multinucleados (Figs. 155 y 156) en los que todavía persiste la exina, que posteriormente se rompe dando lugar a embriones derivados de microsporas de mayor tamaño y hasta 12 núcleos (Figs. 157 y 158), en los que en ocasiones se observaba compartimentalización celular.

En paralelo se observaron a los pocos días de iniciado el cultivo, algunos granos de polen uninucleados (Figs. 160 y 161), cuyos núcleos eran de mayor tamaño que los dos núcleos fundidos de los granos bicelulares (Fig. 159). La cromatina mantenía un estado similar de condensación en todos ellos.

### **18.3. Ultraestructura de los granos de polen multinucleados**

Los granos de polen bicelulares atípicos (Fig. 162) encontrados a partir del segundo día de cultivo, mostraron a nivel de microscopía electrónica núcleos reondeados con un mismo patrón de cromatina, caracterizado por abundantes y pequeñas masas de cromatina condensada y un rica región intercromatínica (Fig. 163). Los nucleolos muestran una morfología semejante. Estas características ultraestructurales difieren de las que presentan los granos de polen bicelulares jóvenes durante el desarrollo gametofítico (comparar la Fig. 163 con las Figs. 73 a 78) y en cambio recuerdan a las de células somáticas proliferantes. El citoplasma es rico en orgánulos y ribosomas y la vacuola está muy reducida.

En granos de polen multinucleados (Fig. 164), correspondientes a los estadios del desarrollo esporofítico inducido representados en las figuras 155 y 156, la cromatina se mantiene en estado condensado, principalmente en la periferia del núcleo. El citoplasma es rico en plastídios, que empiezan a llenarse de almidón, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso. Las vacuolas de estas células presentan depósitos densos en su interior al igual que ocurre durante el desarrollo gametofítico (ver Figs. 70 a 72 y 89). El grosor de las paredes que separan las células dentro de un mismo grano de polen multinucleado es diferente, revelando células formadas en distintos ciclos de división (Risueño y col., 1968).

## FIGURAS

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS FIGURAS**

A: Anafase

C: Calosa

CA: Cromosoma anafásico

CG: Célula generativa

CP: Cromatina profásica

CR: Cromatina condensada

CT: Citoplasma

CV: Célula vegetativa

E: Exina

F: Componente fibrilar denso

G: Componente granular

M: Metafase

N: Núcleo

NU: Nucleolo

P: Profase

RI: Región intercromatínica

T: Telofase

TP: Tapetum

V: Vacuola citoplásmica

VA: Vacuola de actividad nucleolar

VR: Vacuola de reactivación nucleolar

⇔ Centros fibrilares homogéneos

▶ Centros fibrilares heterogéneos

➡ Cromatina condensada asociada al nucleolo

↪ Entrada del organizador nucleolar

▶ Cuerpo nuclear

LÁMINA 1

Planta de *Capsicum annuum* L.

Figuras 1 y 2

LÁMINA 1. Planta de *Capsicum annuum* L.

**Figuras 1 y 2:** Planta de *Capsicum annuum* L. en la que se pueden apreciar botones florales de distinto tamaño y flores abiertas (Fig. 1) así como frutos (Fig. 2).

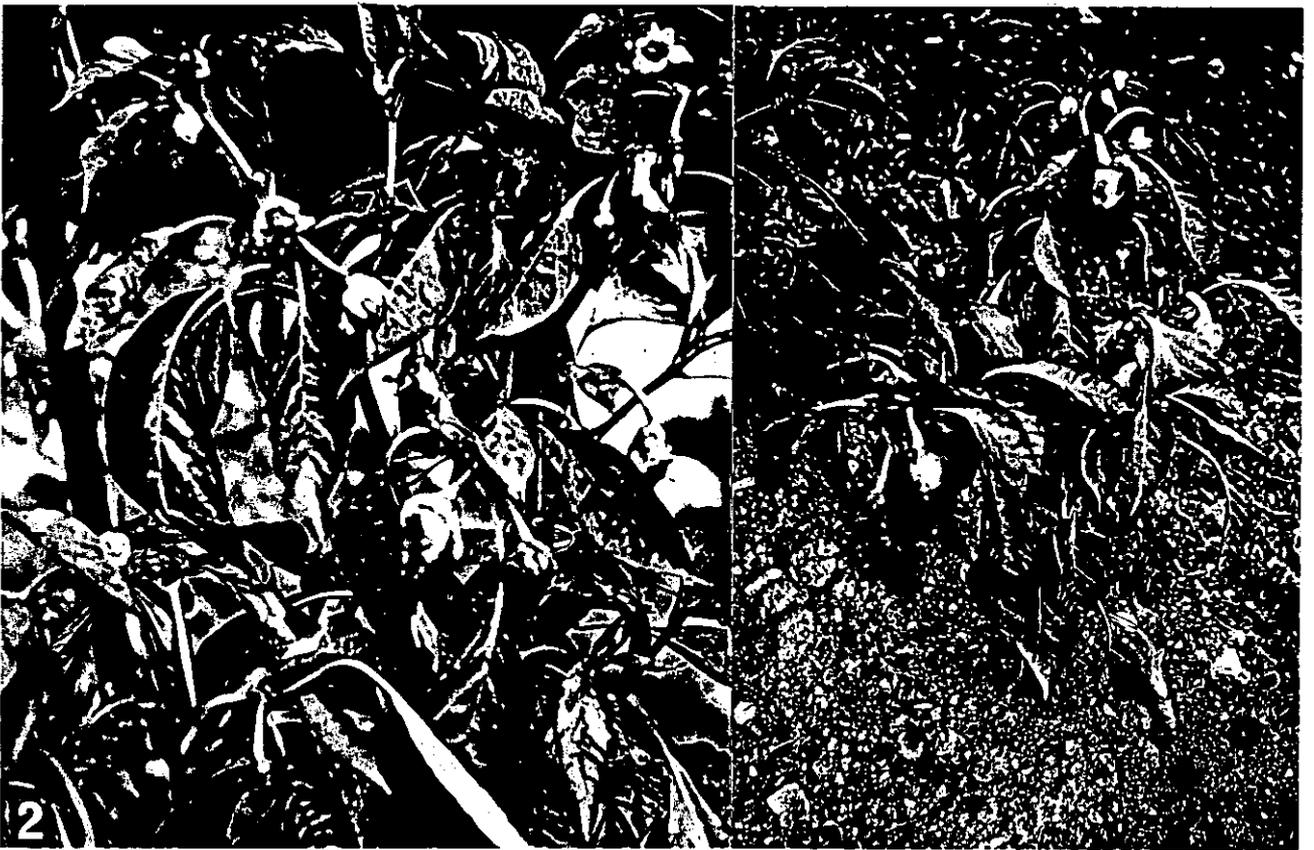
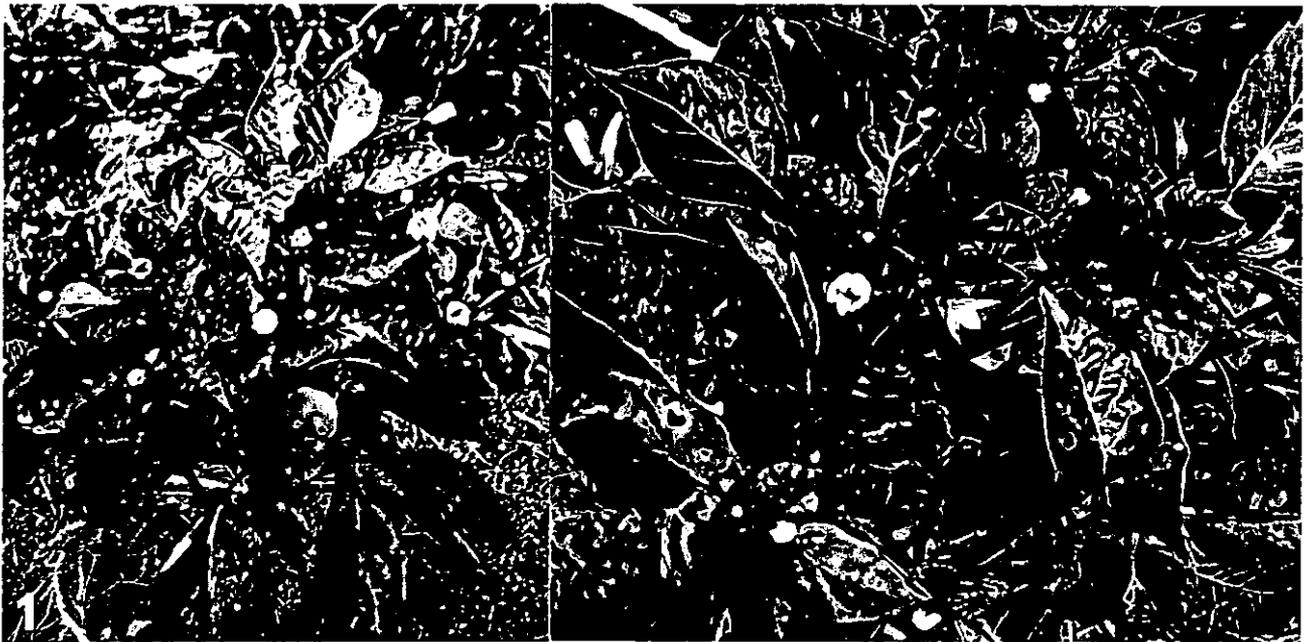


LÁMINA 2

Meristemo radicular de *Allium cepa* L. Tinción con DAPI

Figura 3

LÁMINA 2. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figura 3: Sección longitudinal de un meristemo de raíz de *Allium cepa* L. Corte semifino. Tinción con DAPI. Observación bajo irradiación ultravioleta. Los núcleos celulares así como los cromosomas mitóticos fluorescen intensamente. Se observan células meristemáticas alineadas, de aspecto isodiamétrico, en diferentes momentos del ciclo celular (G1, S, G2 y Mitosis). Las células epidérmicas, situadas en la periferia, son más alargadas. P: profase; M: metafase; A: anafase; T: telofase. Barra = 10µm.



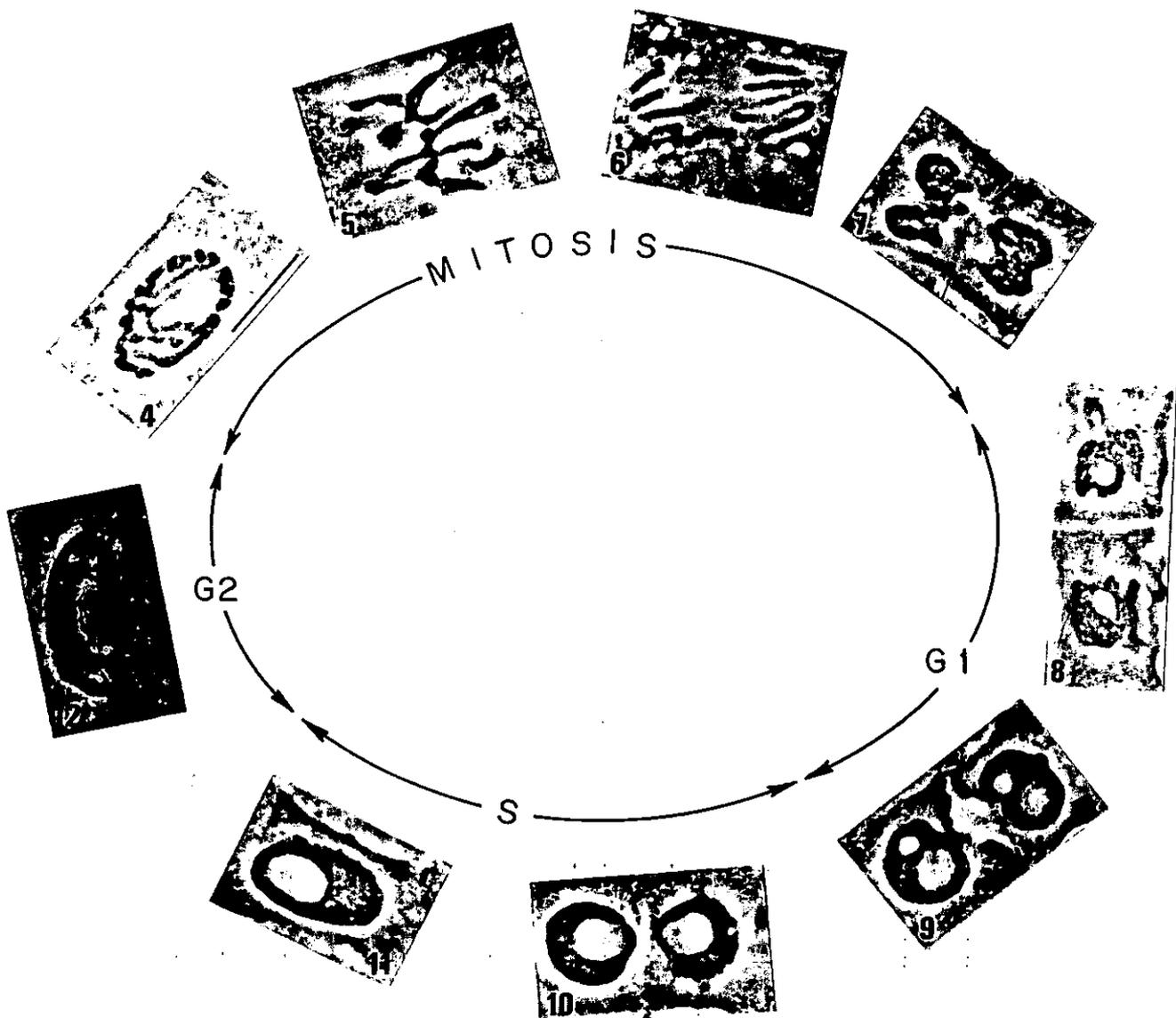
LÁMINA 3

Evolución del ciclo celular en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.

Figuras 4 - 12

LÁMINA 3: Evolución del ciclo celular en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.

**Figuras 4-12:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en diferentes momentos del ciclo celular. Cortes semifinos. Citoquímica NAMA-Ur realizada en bloque e inclusión en Lowicryl. Obsevación bajo contraste de fase. La cromatina y los cromosomas mitóticos están específicamente teñidos. A medida que las células entran en profase (**Fig. 4**) la cromatina se condensa. En metafase (**Fig. 5**) los cromosomas alcanzan el mayor grado de condensación y se disponen en la placa ecuatorial. Durante anafase (**Fig. 6**) las cromátidas hermanas se separan hacia polos opuestos. En telofase (**Fig. 7**) el proceso de división se completa y comienza a formarse la pared que separa a las dos células hijas (flechas). En G1 (**Figs. 8 y 9**) la cromatina se descondensa progresivamente y se rodea de la envoltura nuclear. El núcleo presenta una característica forma lobulada. El tamaño celular aumenta durante la progresión de la fase S (**Figs. 10 y 11**) y el núcleo adopta una forma elíptica. El mayor tamaño celular se alcanza en G2 (**Fig. 12**). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**LÁMINA 4**

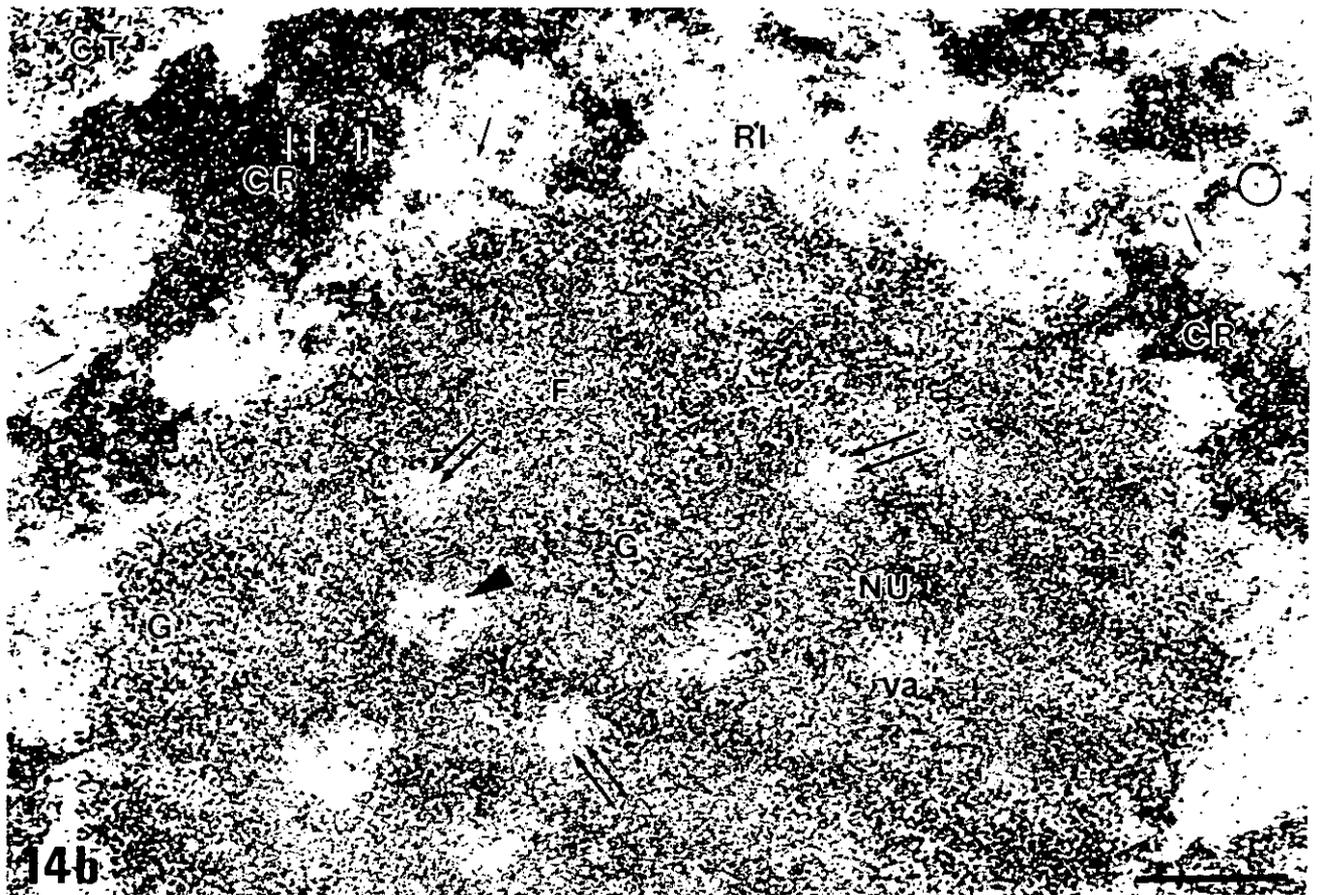
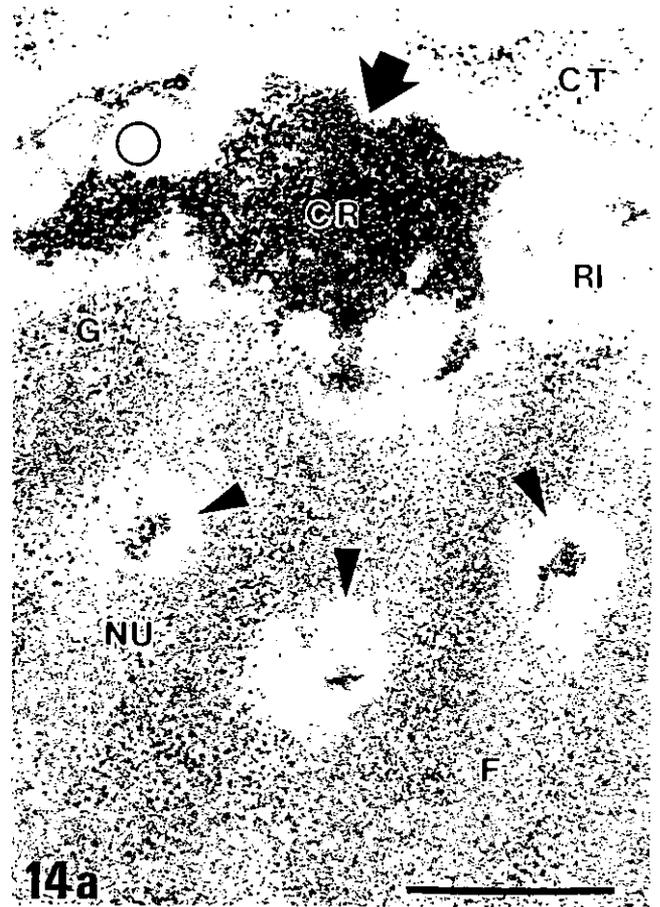
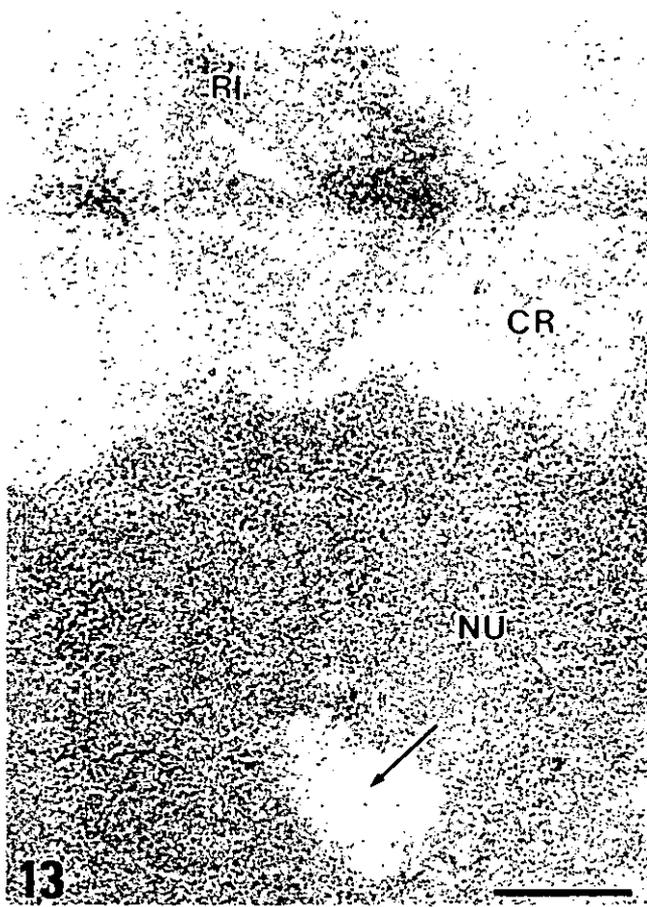
Ultraestructura nuclear. Citoquímica de Metilación-acetilación (MA)

Figuras 13 y 14

## LÁMINA 4. Ultraestructura nuclear. Citoquímica de Metilación-acetilación (MA)

**Figura 13:** Región nuclear de una célula meristemática de raíz de *Allium cepa* L. Inclusión en Lowicryl y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. La cromatina condensada (CR) presenta bajo contraste y la región intercromatínica (RI) es densa, si bien en ella no es posible distinguir entre estructuras granulares y fibrilares. En el nucleolo (NU) sólo se pueden reconocer los centros fibrilares (flecha) que aparecen como pequeñas zonas claras a los electrones, si bien no es posible determinar si se trata de centros fibrilares homogéneos o heterogéneos. Barra = 0.5  $\mu$ m.

**Figura 14:** Regiones nucleares de dos células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en diferente estado de actividad: **a)** núcleo con baja actividad en transcripción ribosómica y **b)** núcleo activo. Citoquímica MA realizada en bloque e inclusión en Lowicryl. Las masas de cromatina condensada (CR) están intensamente contrastadas. En ocasiones se observan algunas de ellas (flechas gruesas) en estrecho contacto con el nucleolo (NU) (**Fig. 14a**). En el nucleolo se distinguen sus principales componentes. El componente granular (G) presenta en nucleolos poco activos (**Fig. 14a**) una disposición periférica, mientras que en nucleolos activos (**Fig. 14b**) rodea y se entremezcla con el componente fibrilar denso (F). Además se reconocen fácilmente los dos tipos de centros fibrilares que existen en plantas. Los centros fibrilares homogéneos (doble flecha) aparecen como pequeñas áreas claras a los electrones con material fibrilar en su interior y abundan en nucleolos activos (**Fig. 14b**). Los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha) presentan en su interior pequeñas inclusiones de cromatina condensada (**Figs. 14a y b**) que parecen estar conectadas con masas de cromatina peri o intranucleolares (flechas gruesa) y son más numerosos en nucleolos poco activos (**Fig. 14a**). En nucleolos activos se observan vacuolas de actividad (VA) que presentan en su interior partículas preribosómicas y están relacionadas con el componente granular. En la región intercromatínica (RI) se reconocen estructuras granulares (círculos) y fibrilares (flechas) (**Figs. 14a y b**). En el citoplasma (CT) aparecen bien contrastadas las regiones ricas en ribosomas. Barra = 0.5  $\mu$ m.



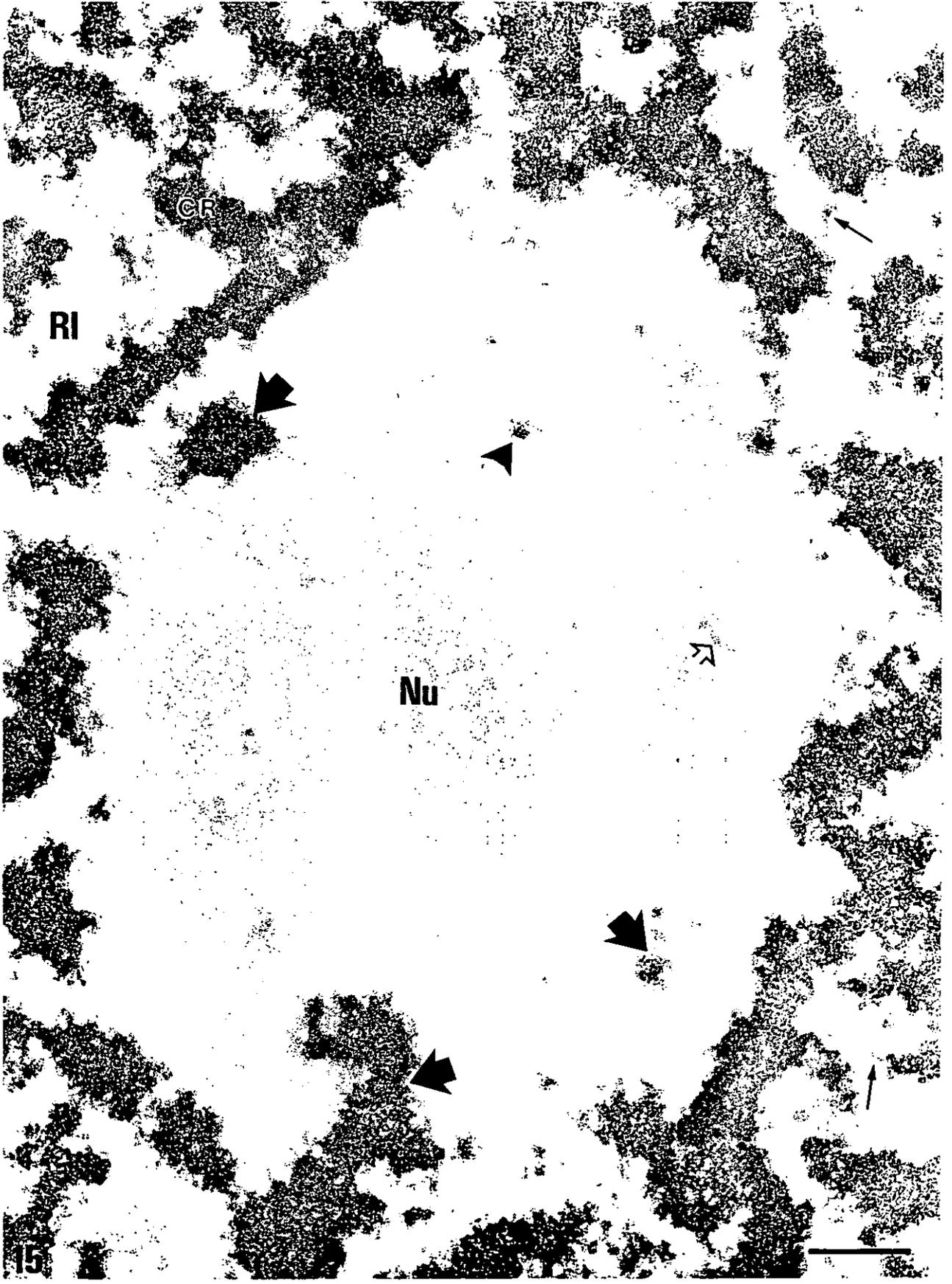
**LÁMINA 5**

Ultraestructura nuclear. Citoquímica NAMA-Ur

Figura 15

LÁMINA 5. Ultraestructura nuclear. Citoquímica NAMA-Ur.

**Figura 15:** Región nuclear de una célula meristemática de raíz de *Allium cepa* L. Citoquímica NAMA-Ur realizada en bloque e inclusión en Lowicryl. Las masas de cromatina condensada (CR) extranucleolares aparecen específicamente teñidas así como aquellas (flechas gruesas) próximas o en el interior del nucleolo (NU). En la región intercromatínica (RI) se aprecian fibras de cromatina descondensada (flechas). El nucleolo aparece claro a los electrones. En su interior se distinguen las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha) y fibras de cromatina descondensada (flechas abiertas). Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



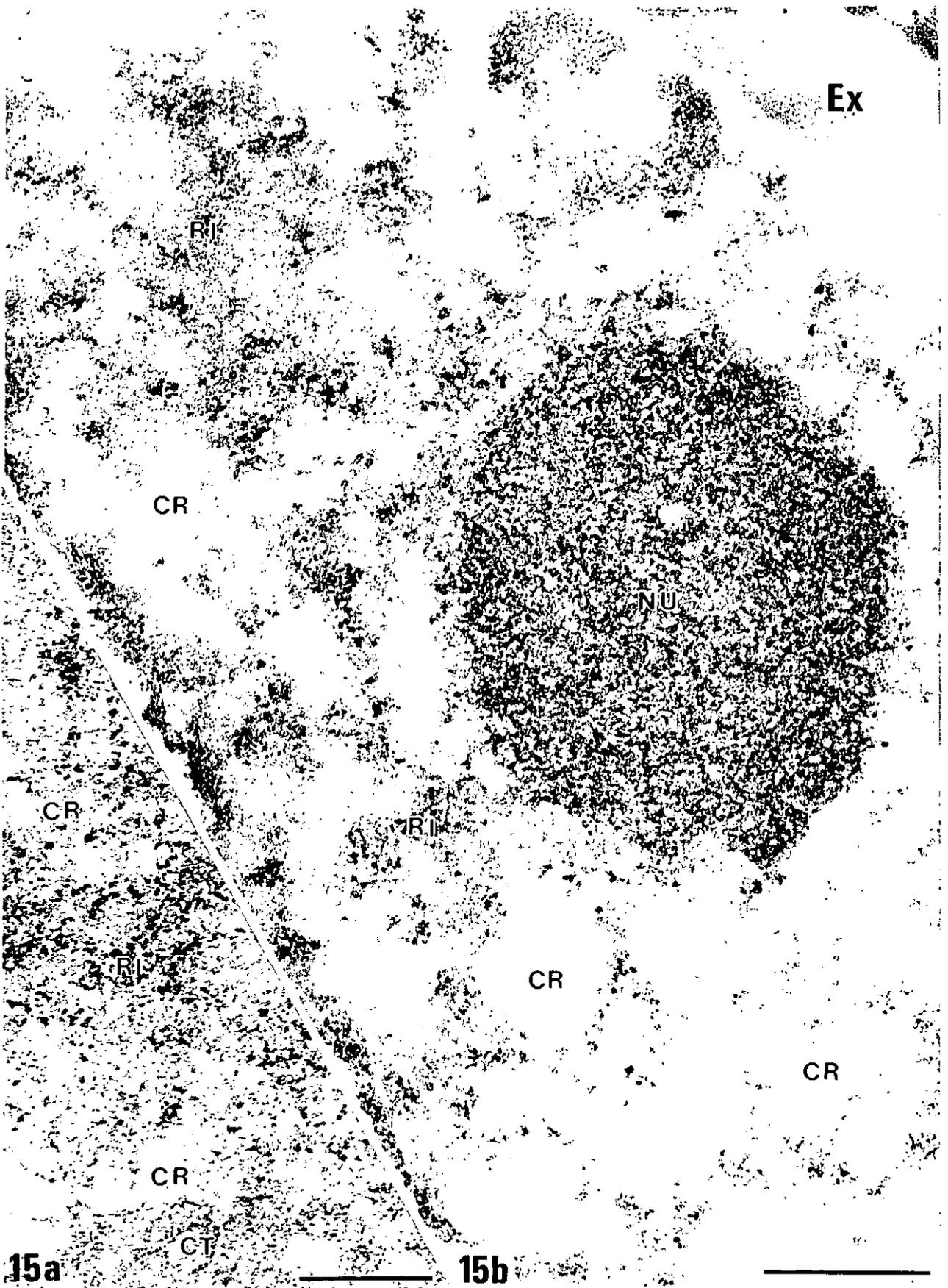
**LÁMINA 6**

Ultraestructura nuclear. Tinción de EDTA

Figuras 15 a y b

LÁMINA 6: Ultraestructura nuclear. Tinción de EDTA

**Figuras 15a y b:** Regiones nucleares de microsporas de *Capsicum annuum* L. Inclusión en Lowicryl y tinción de los cortes con EDTA. Los dominios nucleares ricos en ribonucleoproteínas están preferencialmente contrastados. El nucleolo (NU) y la región intercromatínica (RI) aparecen teñidos, mientras que las regiones que contienen cromatina (CR) muestran un bajo contraste. Obsérvese como en núcleos activos (**Fig. 15a**) el volumen ocupado por la región intercromatínica es mayor que en nucleos menos activos (**Fig. 15b**) a la vez que en el área cromatínica se observa el fenómeno contrario, siendo de mayor tamaño en nucleos poco activos (**Fig. 15b**). El citoplasma (CT) también se tiñe con EDTA. Ex: Exina. Barra 0.5  $\mu$ m.



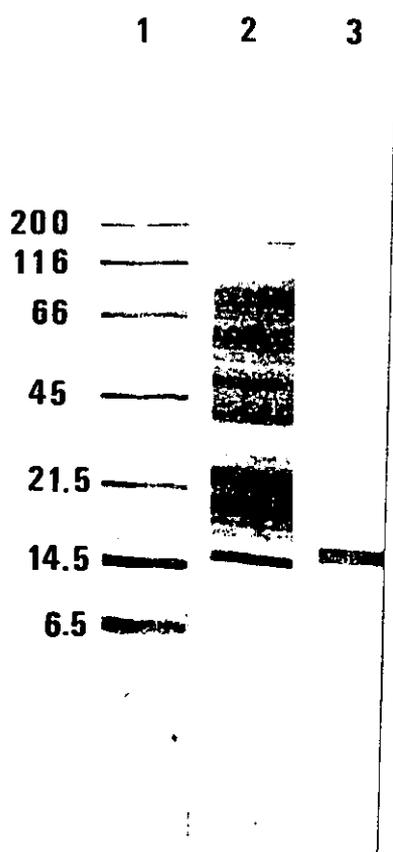
**LÁMINA 7**

Immunodetección de histonas H4 y H2B sobre membranas

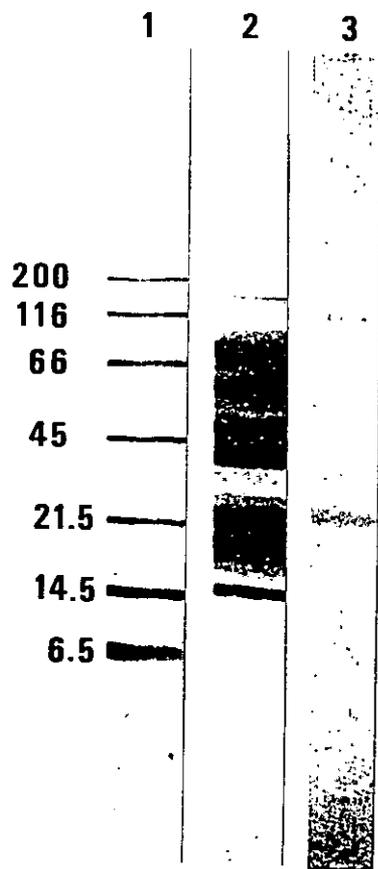
Figuras 16 y 17

LÁMINA 7. Inmunodetección de histonas H4 y H2B sobre membranas.

**Figuras 16 y 17:** Inmunolocalización de las histonas H4 (Fig. 16) y H2B (Fig. 17) en extractos de proteínas totales de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Línea 1: marcadores de pesos moleculares con proteínas preteñidas; Línea 2: patrón de las proteínas totales transferidas. Tinción con amido black. Línea 3: detección de la histona H4 ( Fig. 16) y H2B (Fig. 17); se reconocen bandas únicas de 14 y 20 kD, respectivamente.



16



17

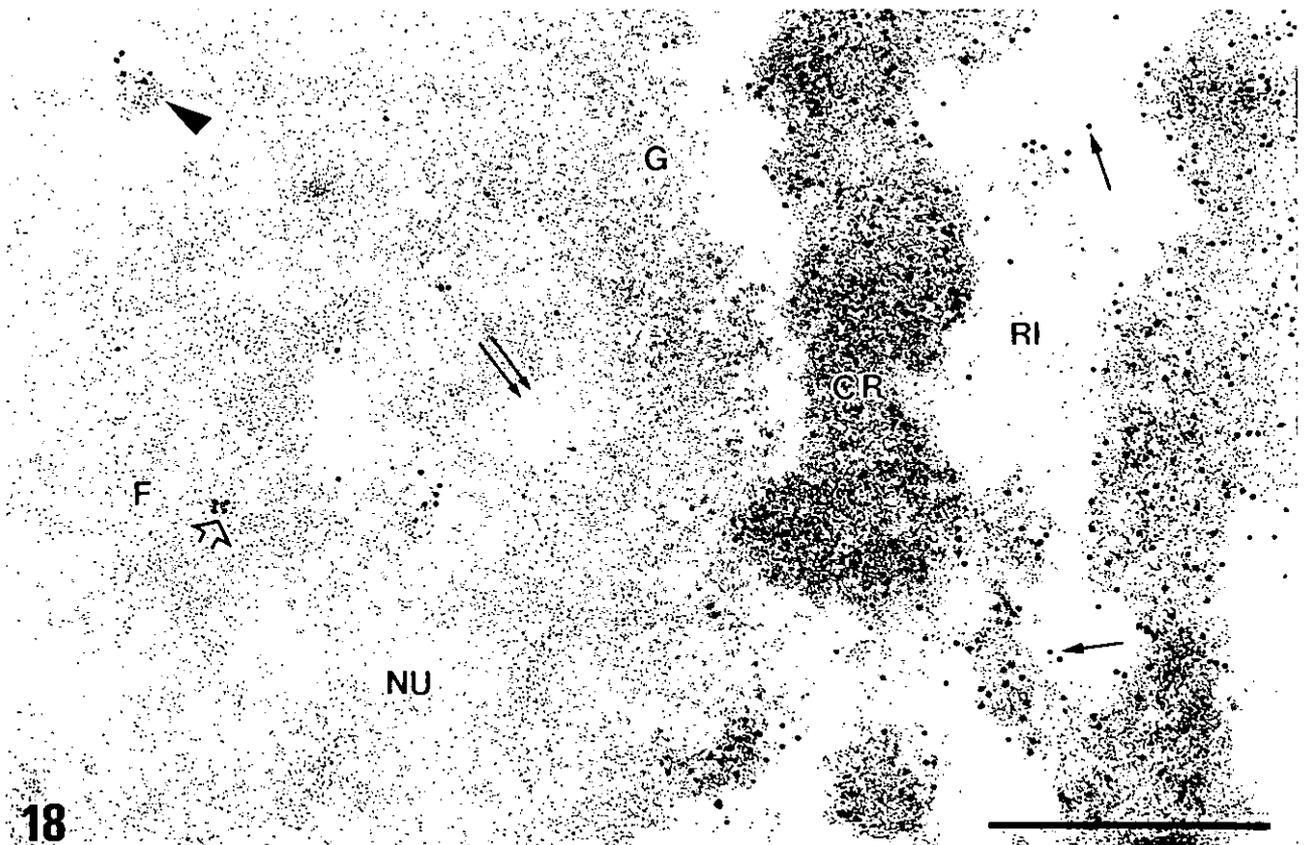
**LÁMINA 8**

Inmunolocalización ultraestructural de la histona H4 en combinación con la  
citoquímica MA

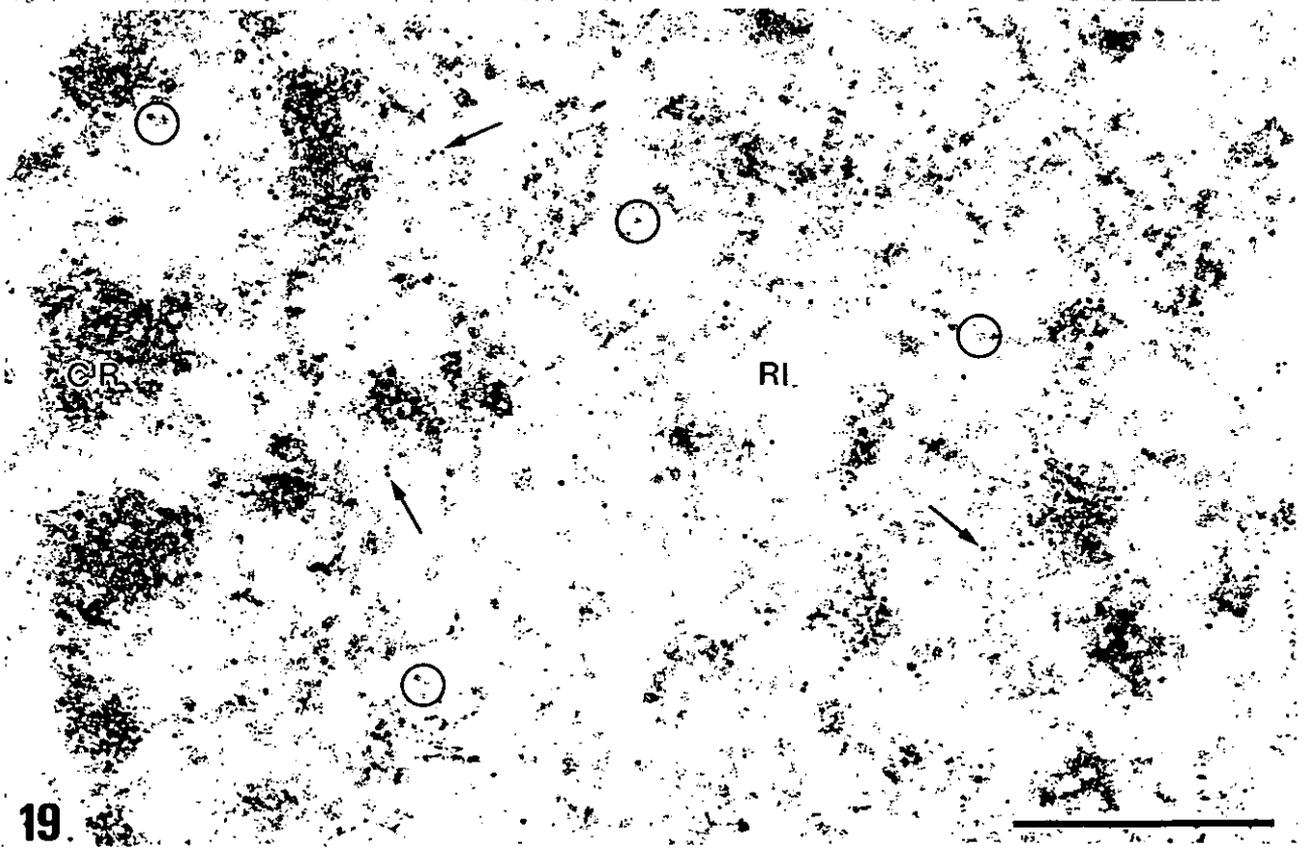
Figuras 18 y 19

## LÁMINA 8. Inmunolocalización ultraestructural de la histona H4

**Figuras 18 y 19:** Regiones nucleares de una célula meristemática de raíz de *Allium cepa* L. (**Fig. 18**) y una microspora vacuolada de *Capsicum annuum* L. (**Fig. 19**). Inmunolocalización de la histona H4 sobre cortes ultrafinos de Lowicryl de muestras tratadas con la citoquímica MA. Las partículas de oro que revelan el anticuerpo anti-histona H4 se localizan sobre las masas de cromatina condensada (CR). Algunas fibras de la región intercromatínica (RI), próximas a la cromatina condensada, están marcadas. Los gránulos (círculos) de la región intercromatínica no presentan marcado. En el nucleolo el marcado aparece sobre las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha), en los centros fibrilares homogéneos (doble flecha) y ciertas regiones (flechas abiertas) del componente fibrilar denso (F). El componente granular (G) está prácticamente libre de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu$ m.



18



19

LÁMINA 9

Immunolocalización ultraestructural de la histona H2B y doble inmunolocalización de la histona H4 y DNA en combinación con la citoquímica MA

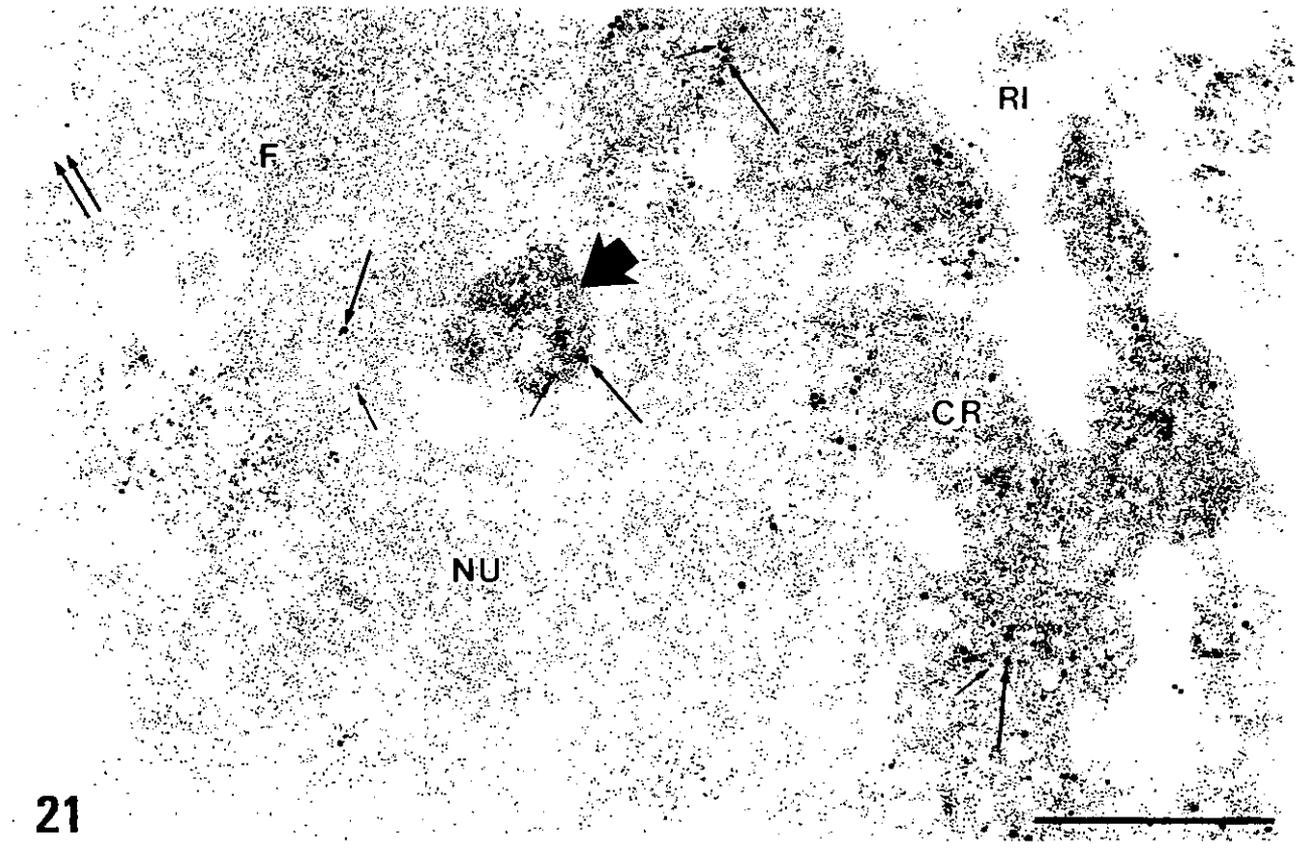
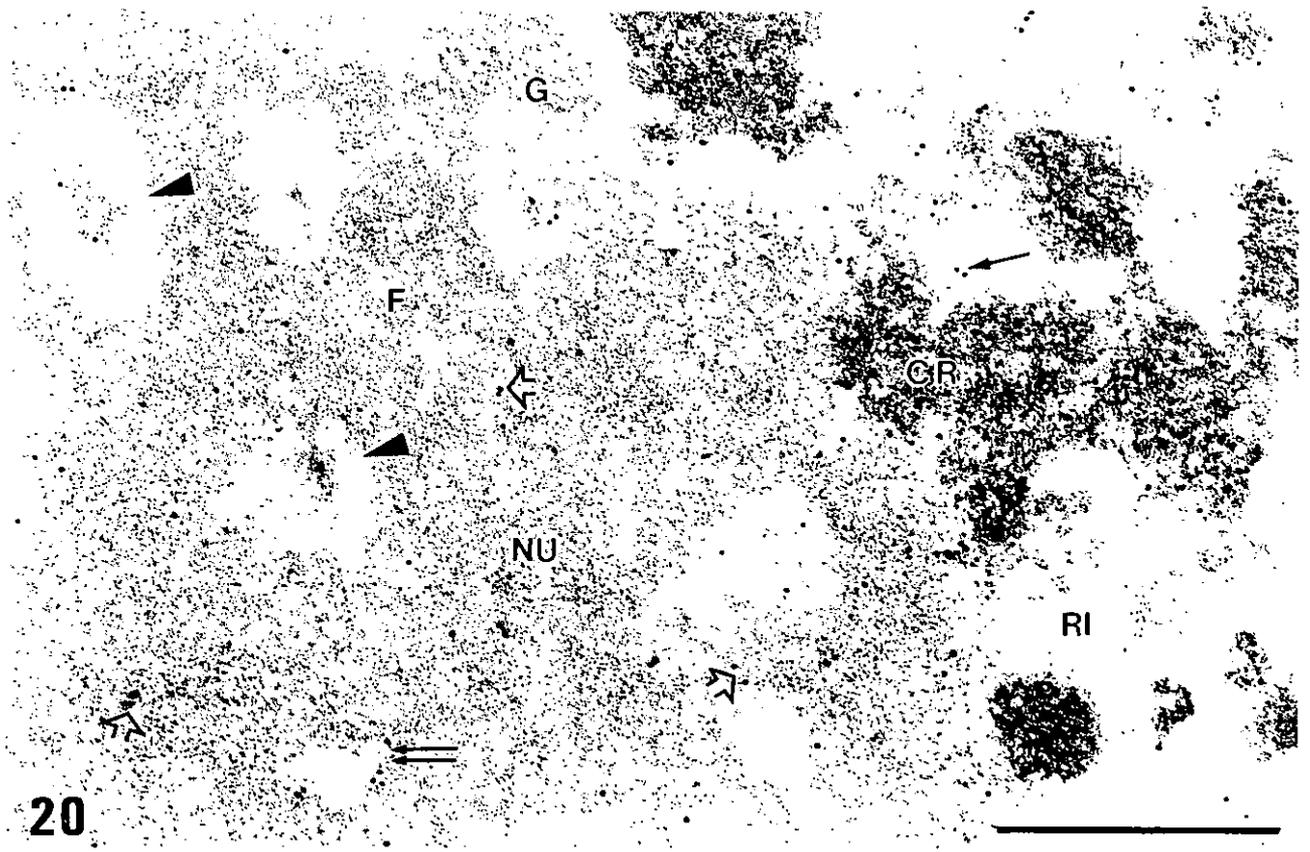
Figuras 20 y 21

LÁMINA 9. Inmunolocalización ultraestructural de la histona H2B y doble inmunolocalización de la histona H4 y DNA

**Figuras 20 y 21:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Inmunolocalización de la histona H2B (Fig. 20) y doble inmunolocalización de la histona H4 y DNA (Fig. 21) en cortes ultrafinos de Lowicryl de muestras tratadas con la citoquímica MA.

**Figura 20:** Las partículas de oro que revelan el anticuerpo anti-histona H2B se localizan en las masas de cromatina condensada (CR). Algunas fibras de la región intercromatínica (RI), próximas a la cromatina condensada, están marcadas. En el nucleolo (NU) el marcado aparece sobre las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha), en los centros fibrilares homogéneos (doble flecha) y ciertas regiones (flechas abiertas) del componente fibrilar denso (F). El componente granular (G) está prácticamente libre de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu$ m.

**Figura 21:** Las partículas de oro de 15 nm (flechas largas) revelan DNA y las de 10 nm (flechas cortas) la histona H4. Granos de oro de ambos tamaños se localizan en las masas de cromatina condensada extranucleolar (CR) e inclusiones de cromatina condensada (flechas gruesas) en el interior del nucleolo (NU). En el nucleolo el doble marcado aparece en ciertas regiones del componente fibrilar denso (F). RI: región intercromatínica; doble flecha: centros fibrilares homogéneos. Barra = 0.5  $\mu$ m.



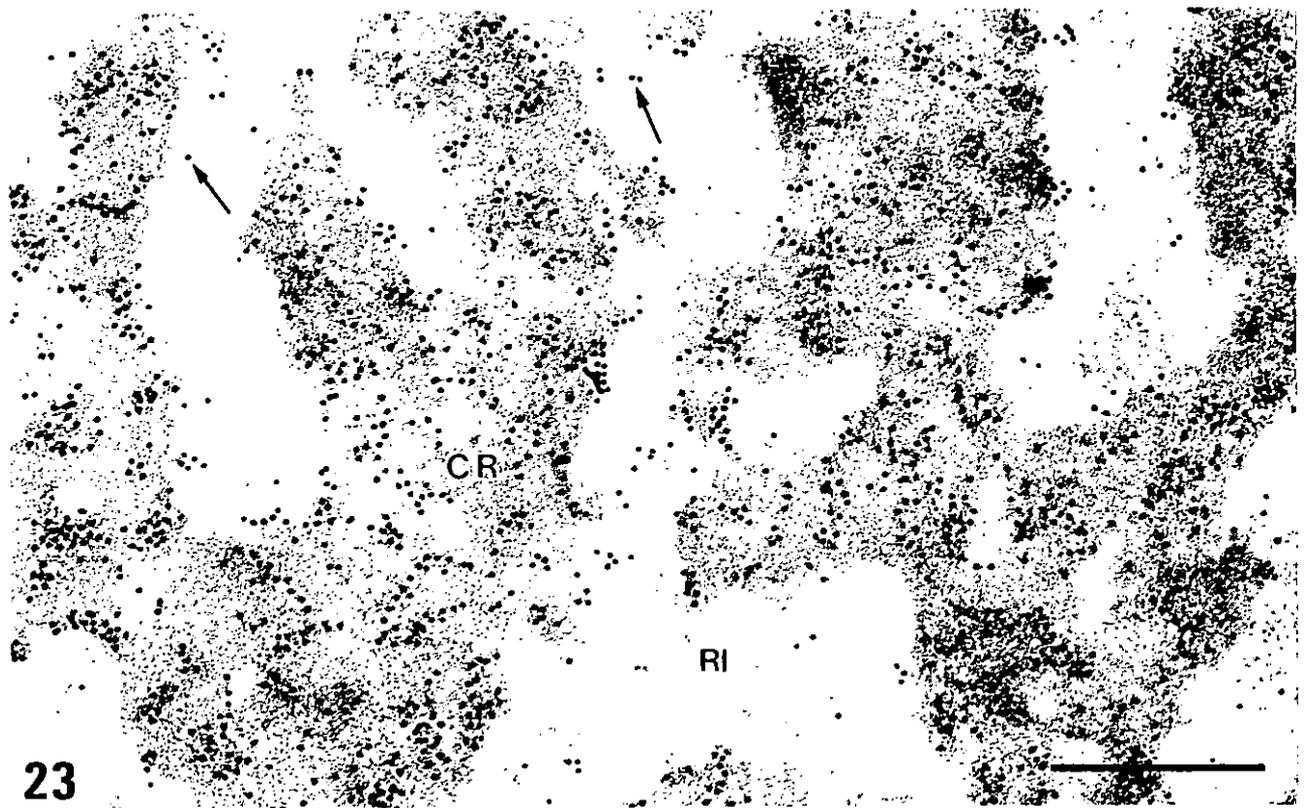
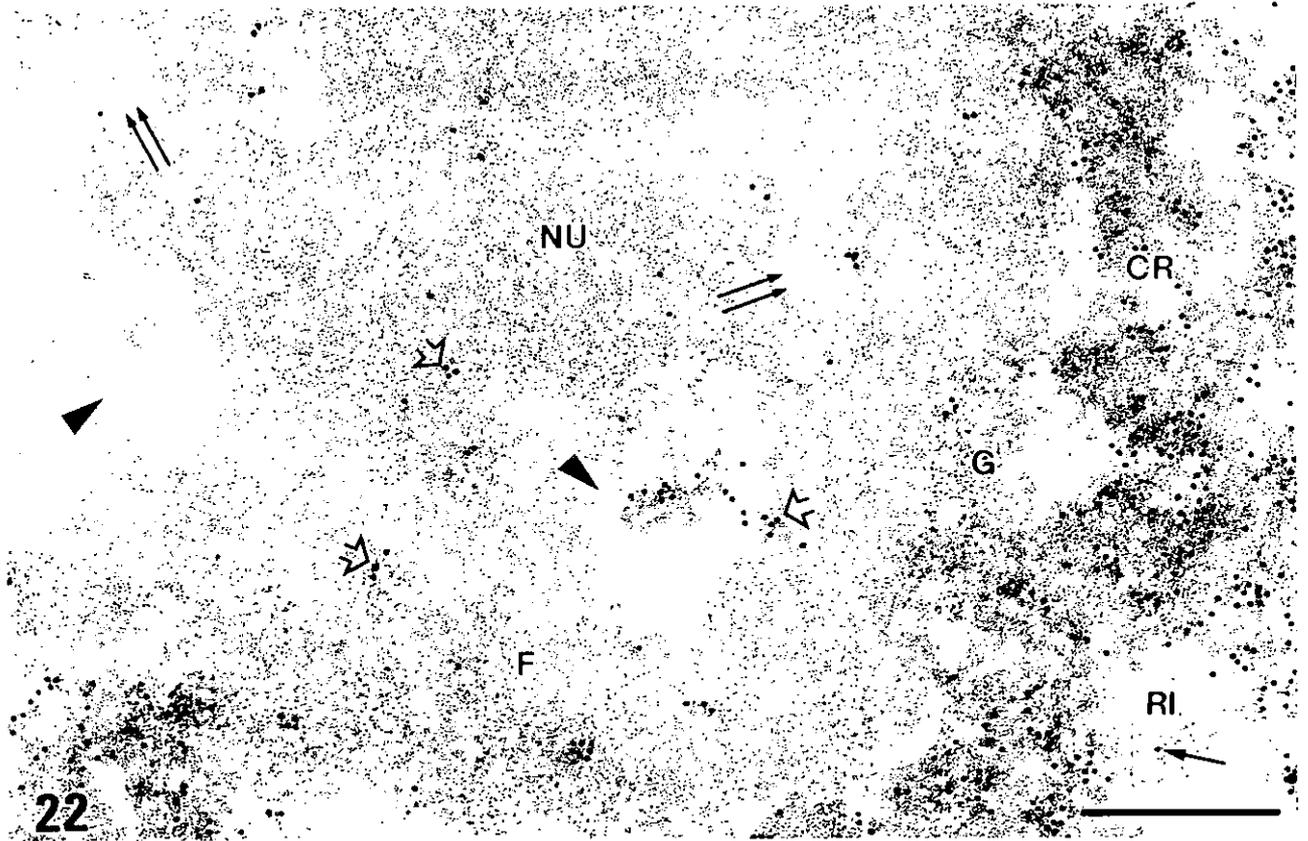
**LÁMINA 10**

Immunolocalización ultraestructural de DNA en combinación con la citoquímica MA

Figuras 22 y 23

## LÁMINA 10. Inmunolocalización ultraestructural de DNA.

**Figuras 22 y 23:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Inmunolocalización de DNA en cortes ultrafinos de Lowicryl de muestras tratadas con la citoquímica MA. El patrón de marcado es semejante al obtenido con los anticuerpos anti-histona H4 y H2B. Las partículas de oro se localizan en las masas de cromatina condensada (CR) y algunas fibras (flechas) de la región intercromatínica (RI), situadas en las proximidades de las masas de cromatina condensada. En el nucleolo (NU) el marcado aparece en las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha), centros fibrilares homogéneos (doble flecha) y ciertas regiones (flechas abiertas) del componente fibrilar denso (F). El componente granular (G) está prácticamente libre de marcado. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 11**

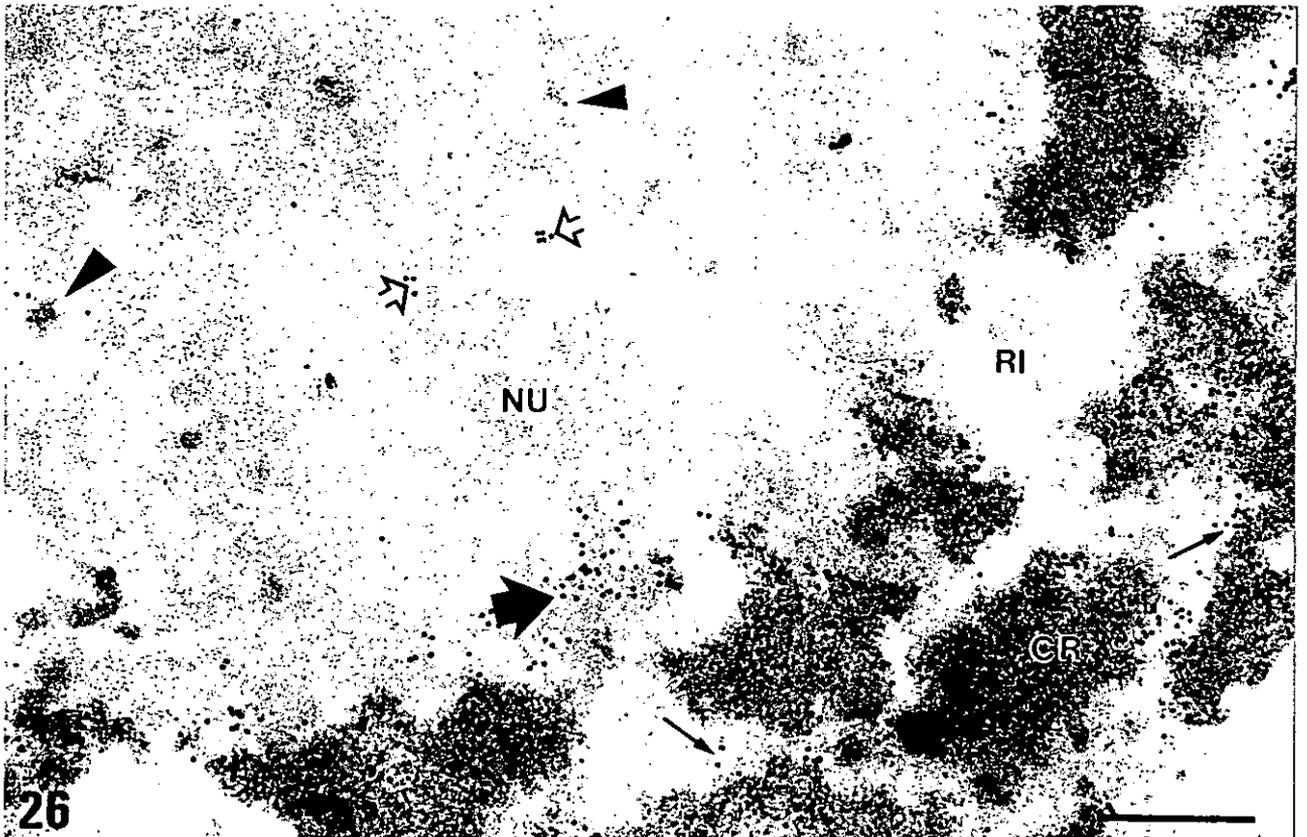
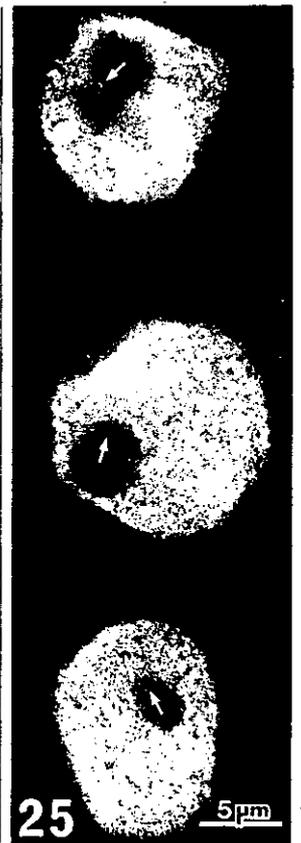
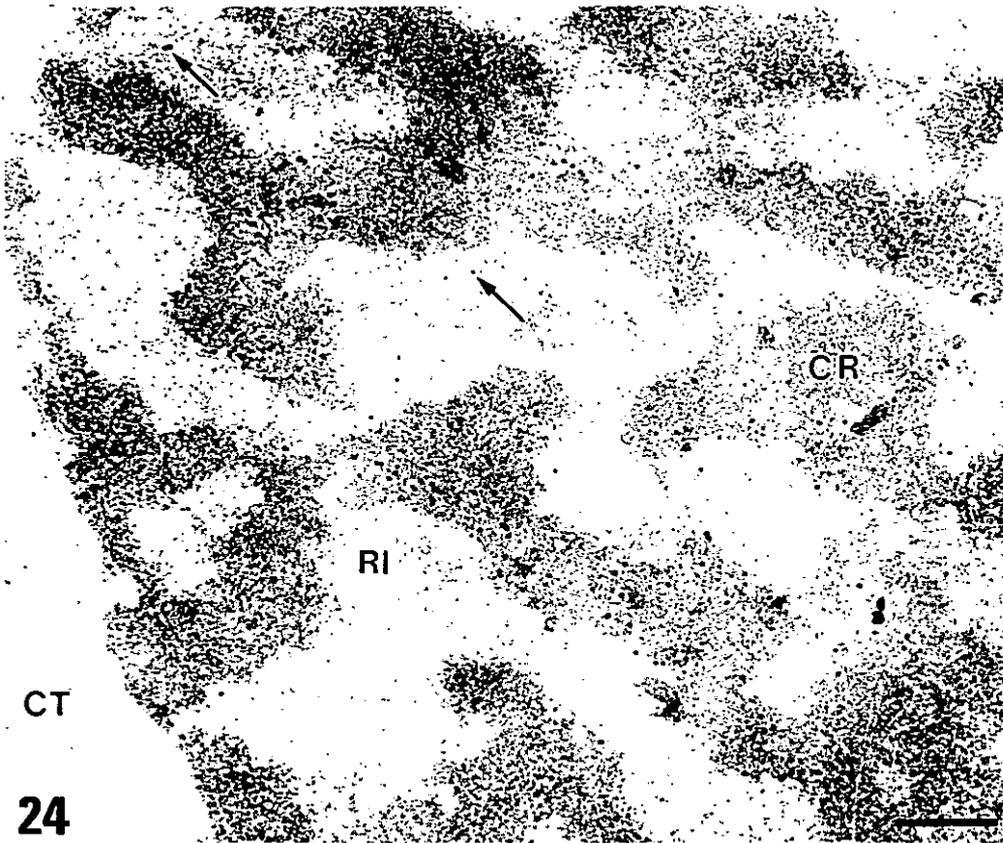
Inmunolocalización ultraestructural de la histona H4 y DNA en combinación con la  
citoquímica NAMA-Ur

Figuras 24-26

LÁMINA 11. Inmunolocalización ultraestructural de la histona H4 y DNA en combinación con la citoquímica NAMA-Ur.

**Figuras 24 y 26:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Inmunolocalización de la histona H4 (Fig. 24) y DNA (Fig. 26) en cortes ultrafinos de Lowicryl teñidos con la técnica de NAMA-Ur. El patrón de marcado es semejante en ambos casos. Las partículas de oro que localizan la histona H4 (Fig. 24) y las que revelan DNA (Fig. 26) aparecen sobre las masas de cromatina condensada extranucleolar (CR) y algunas fibras teñidas (flechas) de la región intercromatínica (RI). En el nucleolo (NU) el marcado se concentra en la cromatina condensada (flecha gruesa), ciertas regiones (flechas abiertas) de bajo contraste del interior nucleolar y centros fibrilares heterogéneos (cabeza de flecha). Barra = 0.5  $\mu$ m.

**Figura 25:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Corte semifino. Tinción con DAPI. Observación bajo irradiación ultravioleta. Se observa una intensa señal de fluorescencia en la cromatina condensada. En el interior del nucleolo se aprecia una débil fluorescencia (flechas). Barra = 5  $\mu$ m.



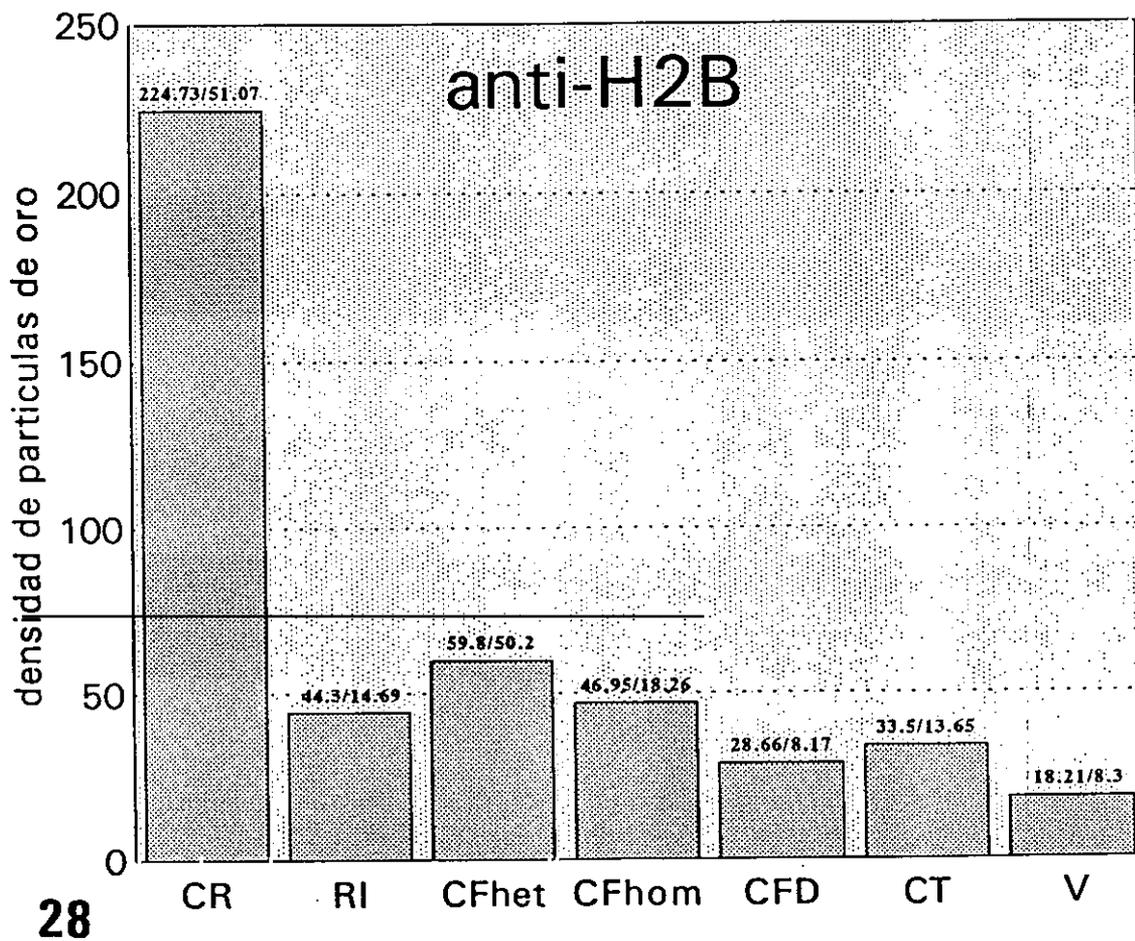
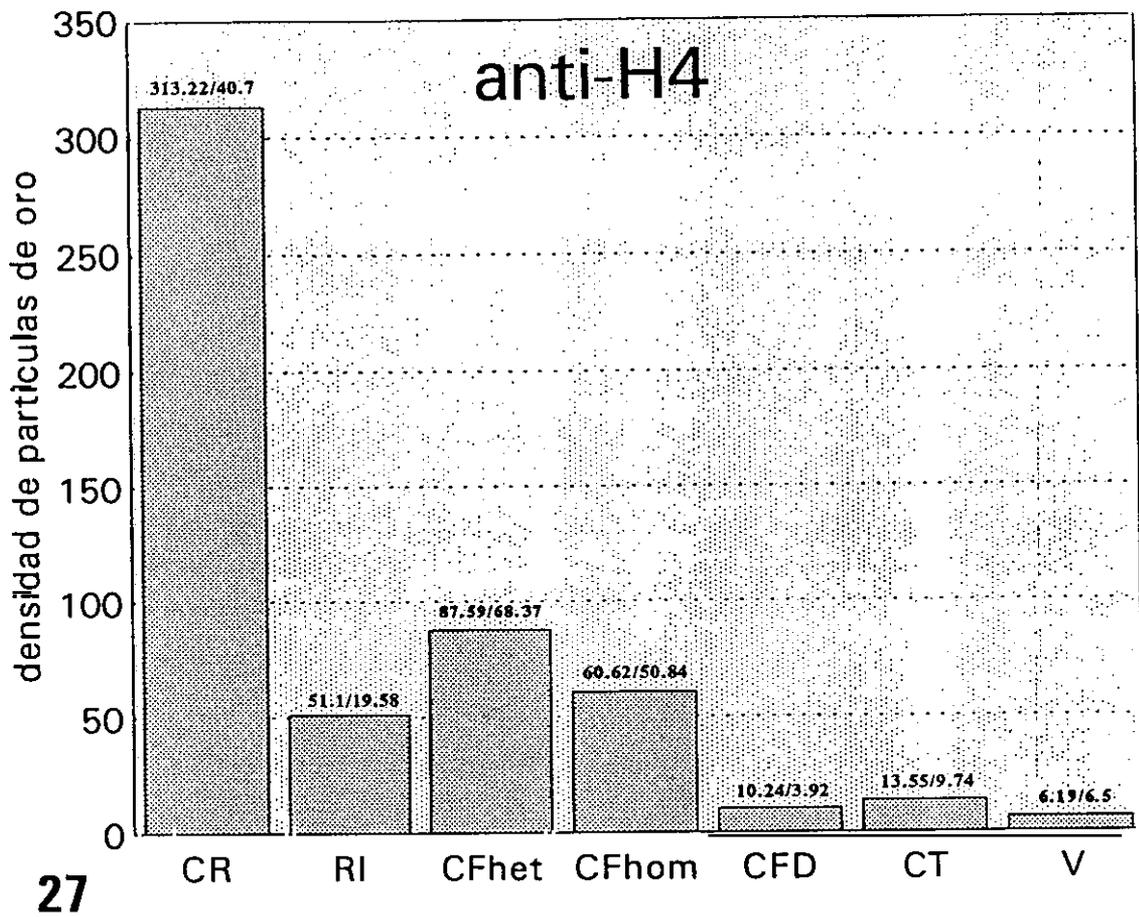
**LÁMINA 12**

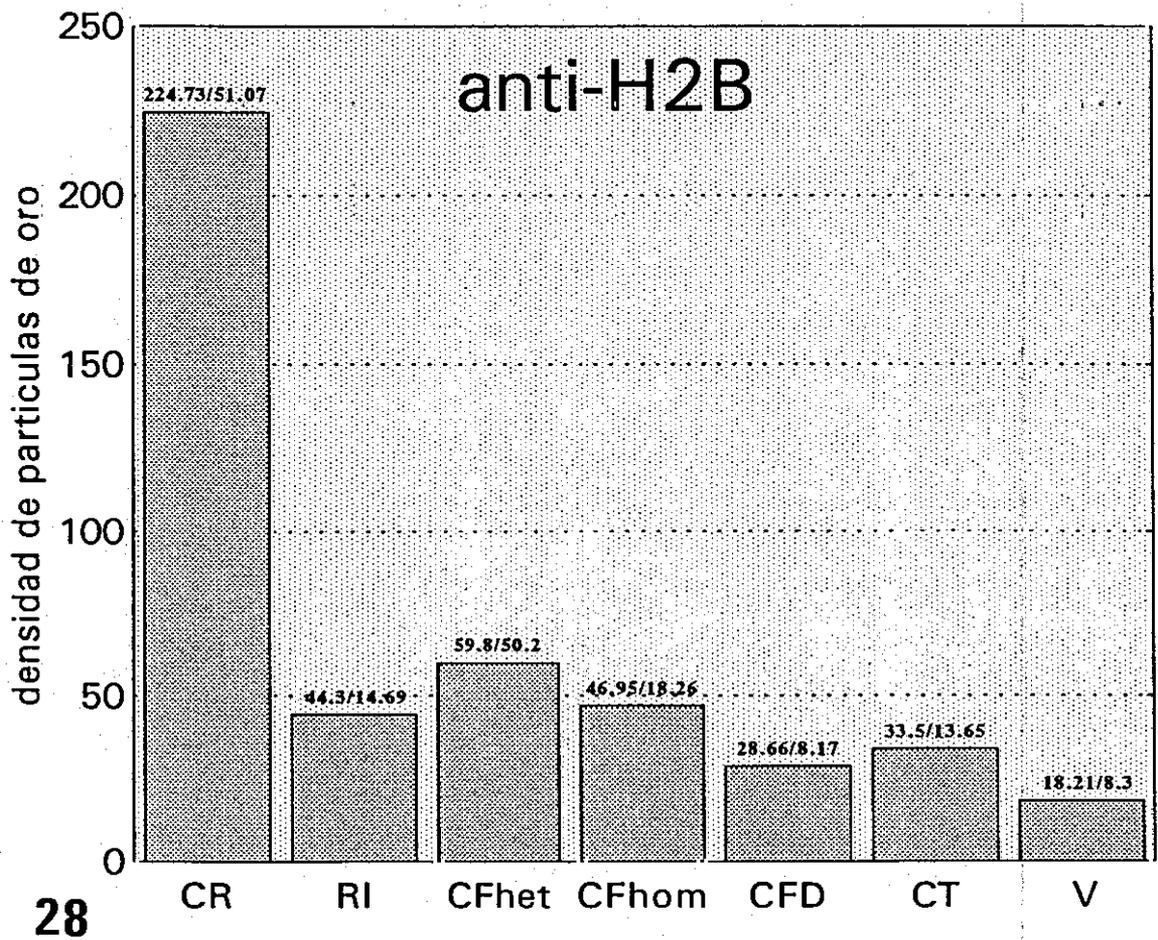
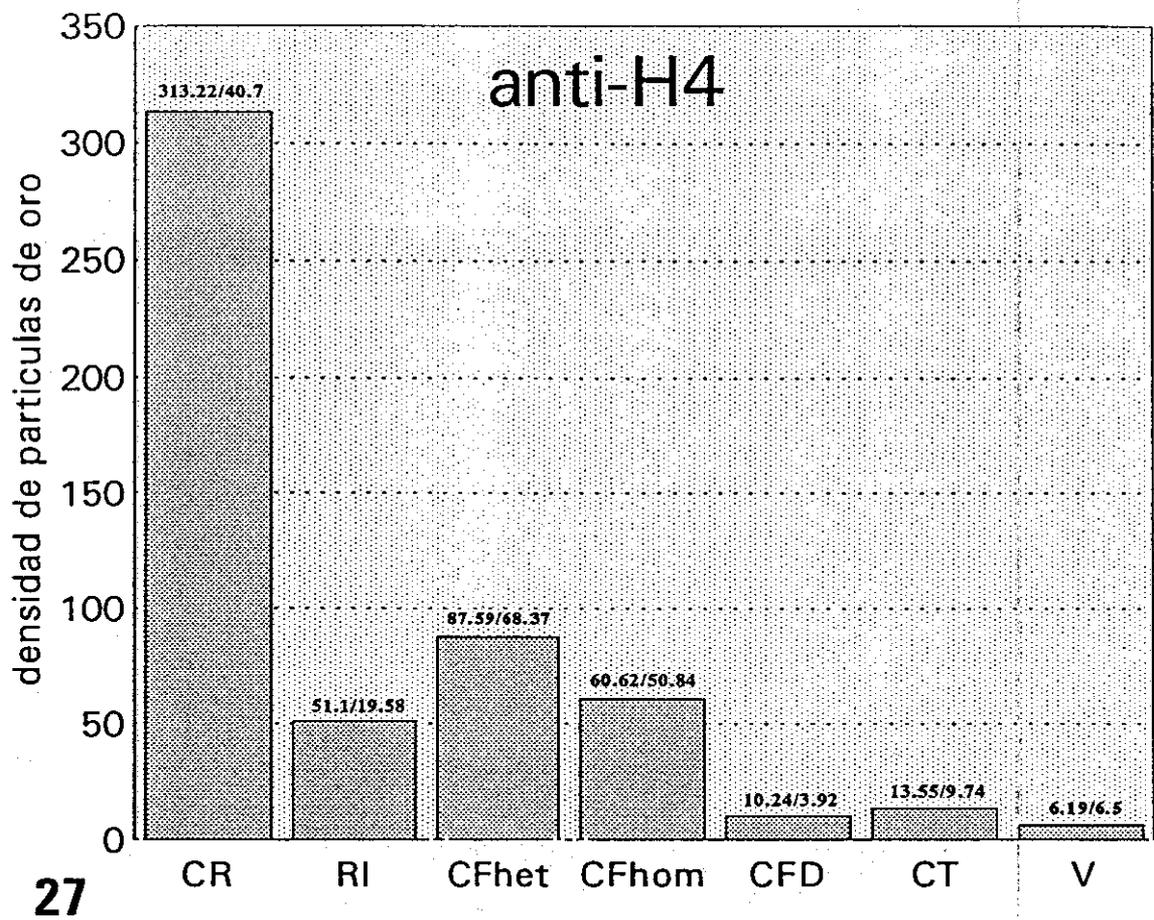
**Análisis estadístico de la distribución del inmunomarcado con anti-histonas H4 y H2B  
sobre distintos compartimentos celulares**

**Figuras 27 y 28**

LÁMINA 12. Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-histonas H4 y H2B sobre distintos compartimentos celulares.

**Figuras 27 y 28:** Representación gráfica de la densidad de inmunomarcado con anti-histonas H4 (Fig. 27) y H2B (Fig. 28) expresada como número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  sobre diferentes compartimentos celulares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Los datos sobre las barras corresponden a los valores medios y las desviaciones típicas. CR: cromatina condensada; RI: región intercromatínica; CFhet: centros fibrilares heterogéneos; CFhom: centros fibrilares homogéneos; CFD: componente fibrilar denso; CT: citoplasma; V: vacuolas citoplásmicas.





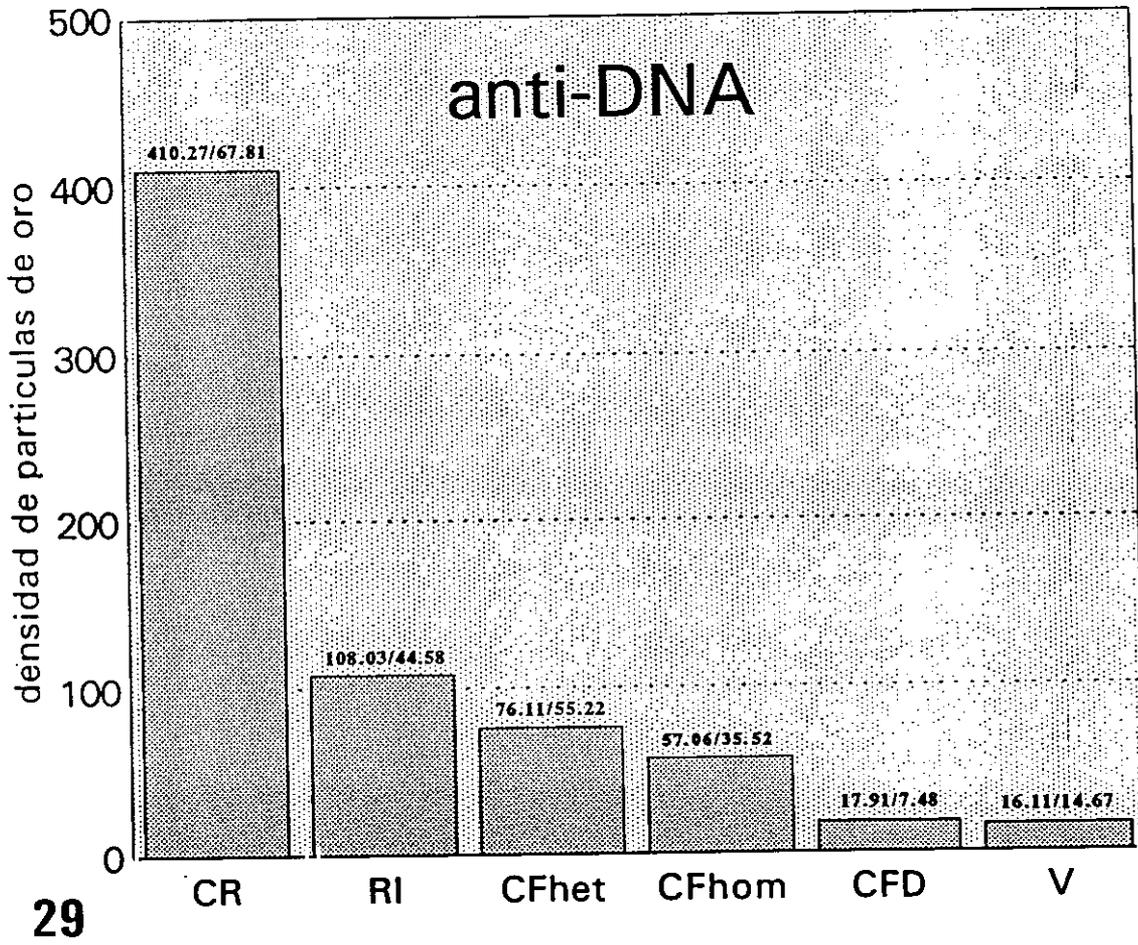
**LÁMINA 13**

Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-DNA sobre distintos compartimentos  
celulares

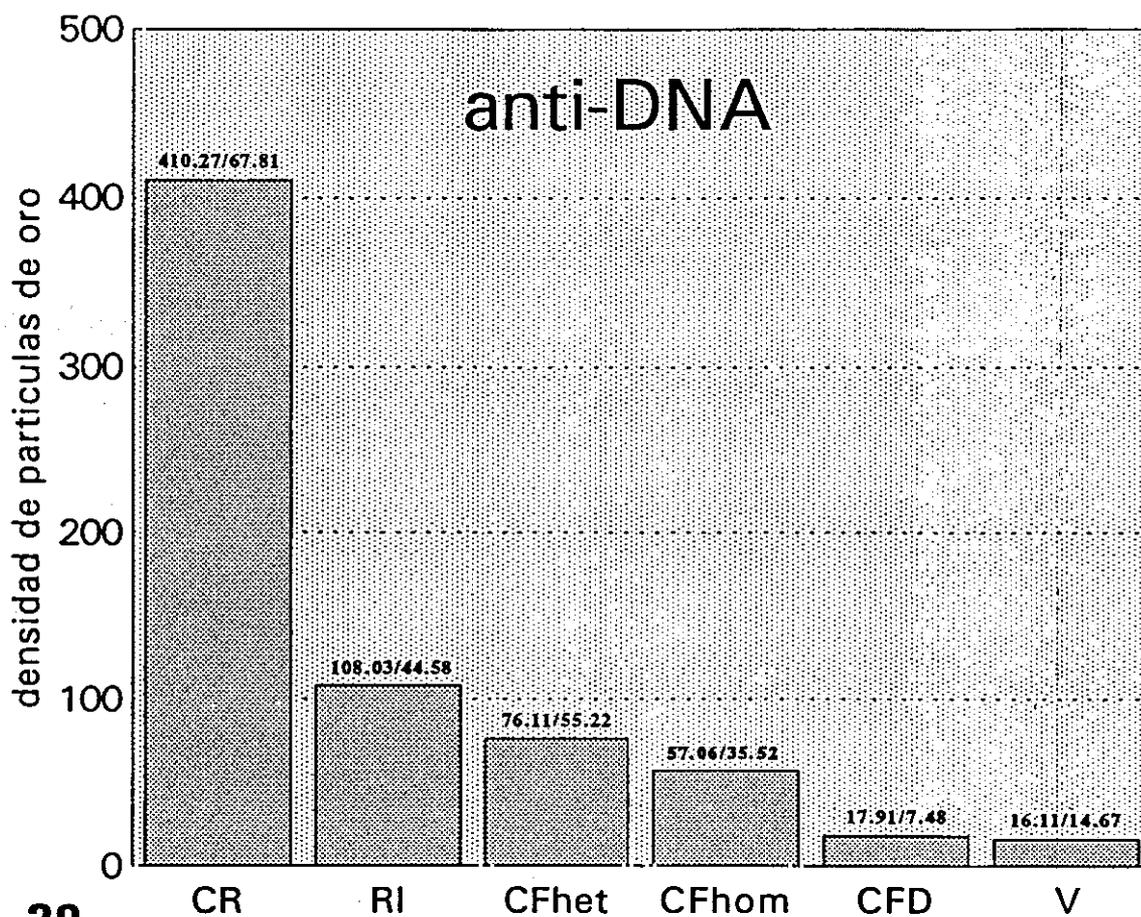
Figura 29

LÁMINA 13. Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-DNA sobre distintos componentes celulares.

**Figura 29:** Representación gráfica de la densidad de inmunomarcado con anti-DNA expresada como número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  sobre diferentes compartimentos celulares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Los datos sobre las barras corresponden a los valores medios y las desviaciones típicas. CR: cromatina condensada; RI: región intercromatínica; CFhet: centros fibrilares heterogéneos; CFhom: centros fibrilares homogéneos; CFD: componente fibrilar denso; V: vacuolas citoplásmicas.



# anti-DNA



**LÁMINA 14**

Localización ultraestructural de los lugares de replicación en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S después de incorporación *in vivo* de BrdU e inmunomarcado con oro, en combinación con la citoquímica MA

Figuras 30 y 31

LÁMINA 14. Localización ultraestructural de los lugares de replicación en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. después de incorporación *in vivo* de BrdU e inmunomarcado con oro, en combinación con la citoquímica MA

**Figuras 30 y 31:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L en fase S. Incorporación *in vivo* de BrdU e inmunomarcado con oro. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro se localizan en fibras (flechas) de cromatina descondensada de la región intercromatínica (RI), próximas a la cromatina condensada. Las masas de cromatina condensada (CR) están libres de marcado, salvo en su periferia (flechas). Barra = 0.5  $\mu$ m.



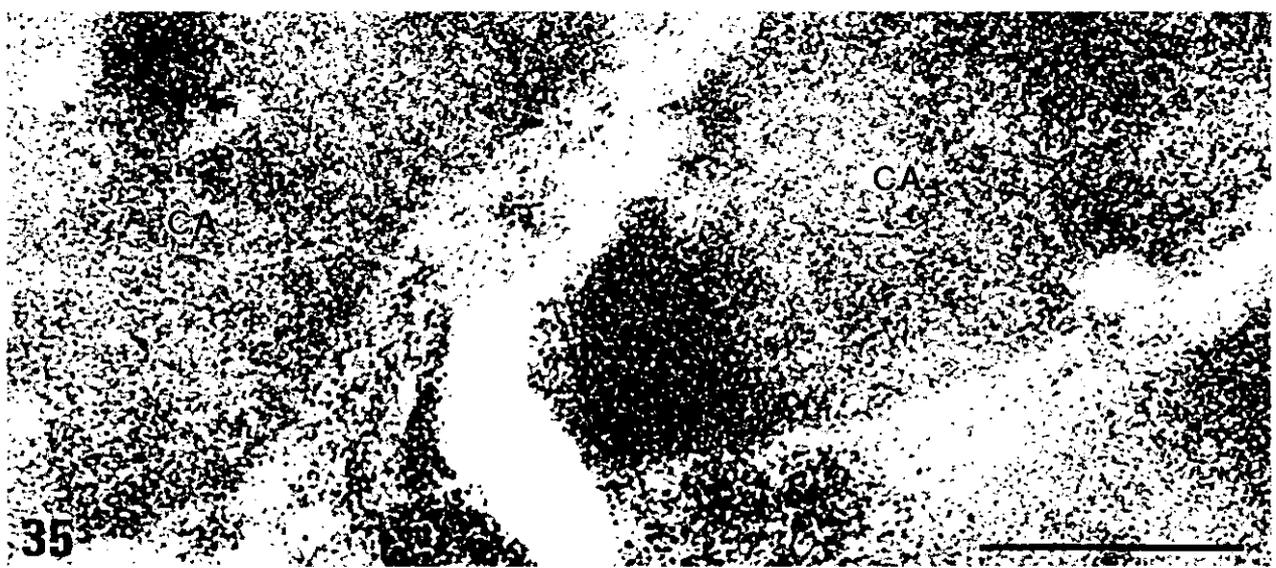
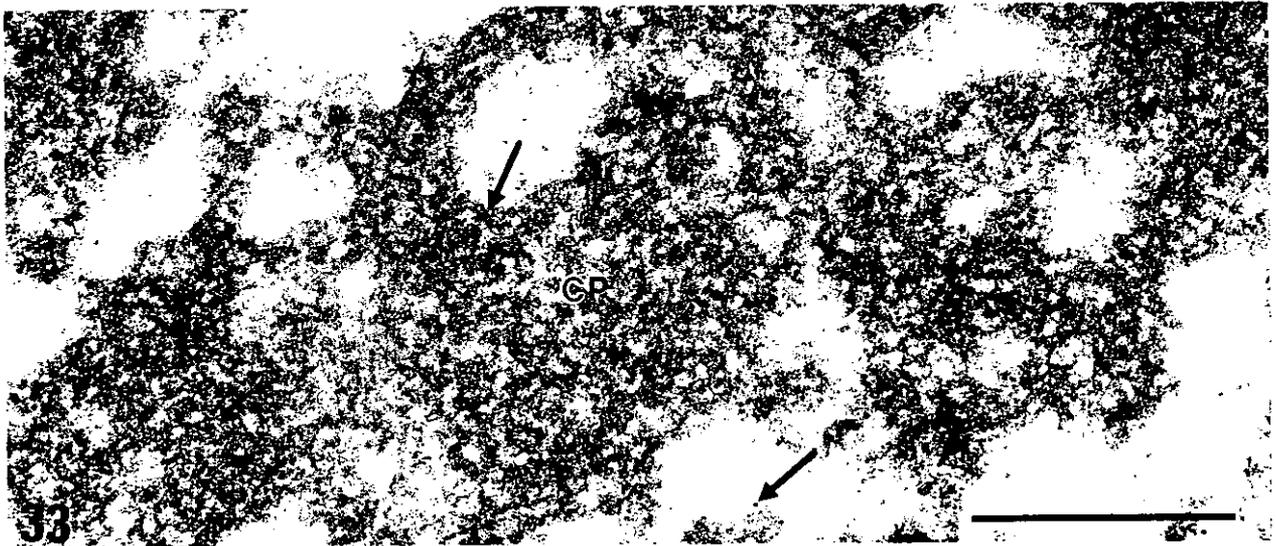
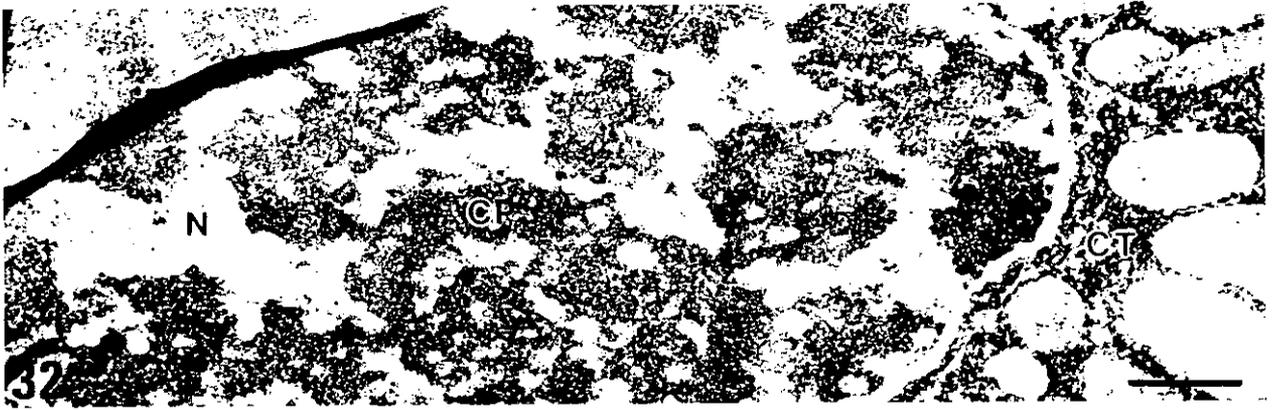
**LÁMINA 15**

Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.  
durante mitosis, en combinación con la citoquímica MA

Figuras 32 - 35

LÁMINA 15. Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. durante mitosis, en combinación con la citoquímica MA.

**Figuras 32-35:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. durante profase (Figs. 32 y 33) y anafase (Figs. 34 y 35). Inmunomarcado con anti-PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. En profase (Fig. 32) la cromatina se condensa y la envoltura nuclear aún persiste. En esta fase las células no se marcan significativamente después de inmunomarcado con anti-PCNA (Fig. 33); ocasionalmente se encuentran escasas partículas de oro (flechas) en la periferia de la cromatina profásica (CP). En anafase (Fig. 34) los cromosomas ya han alcanzado el máximo grado de condensación y las cromátidas hermanas se separan hacia polos opuestos. Los cromosomas anafásicos (CA) no se marcan con anti-PCNA (Fig. 35). En figuras 32 y 34, barra = 1  $\mu\text{m}$ . En figuras 33 y 35, barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



**LÁMINA 16**

Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.  
durante el periodo G1, en combinación con la citoquímica MA

Figuras 36 y 37

LÁMINA 16. Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. durante el periodo G1, en combinación con la citoquímica MA

**Figuras 36 y 37:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. durante el periodo G1. Inmunomarcado con anti-PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. En el periodo G1 (**Fig. 36**) el nucleolo (NU) se reorganiza y la cromatina (CR) se descondensa. El núcleo presenta un típico aspecto lobulado. El marcado con anti-PCNA (flechas) es muy escaso. Se observan algunas partículas de oro aisladas en la región intercromatínica (RI) (**Fig. 37**). En figura 36, barra = 1  $\mu$ m. En figura 37, barra = 0.5  $\mu$ m.

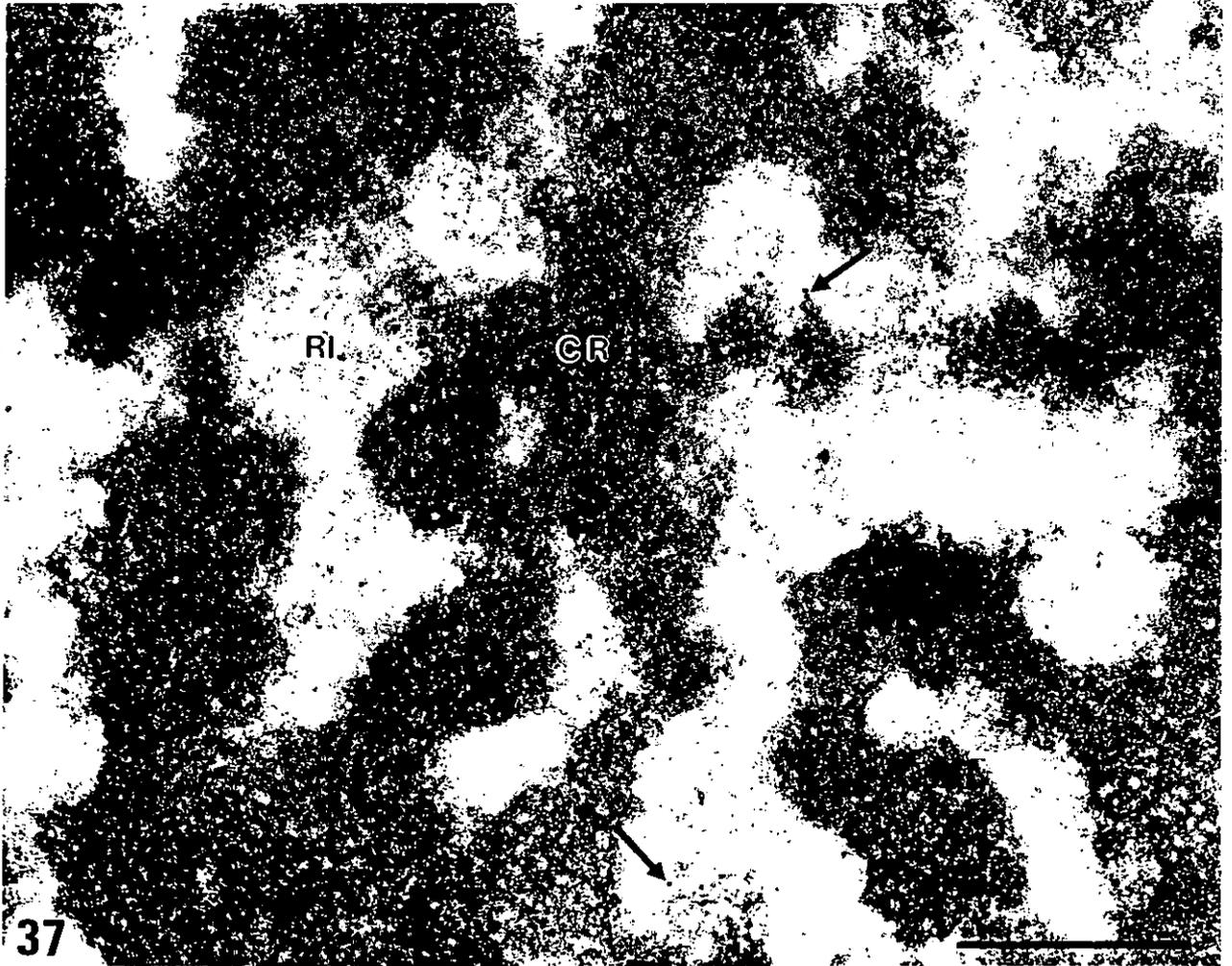
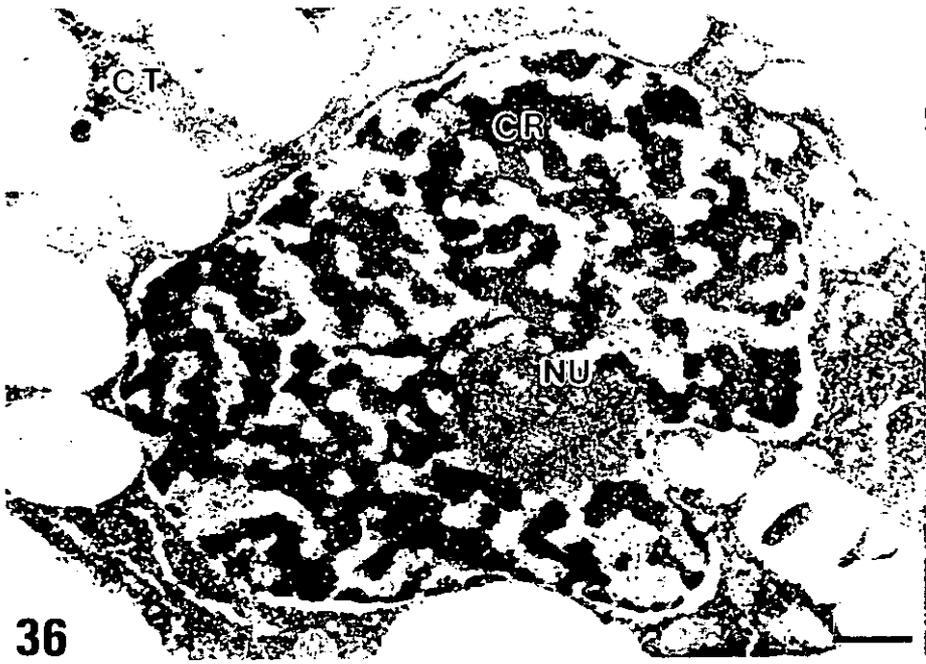


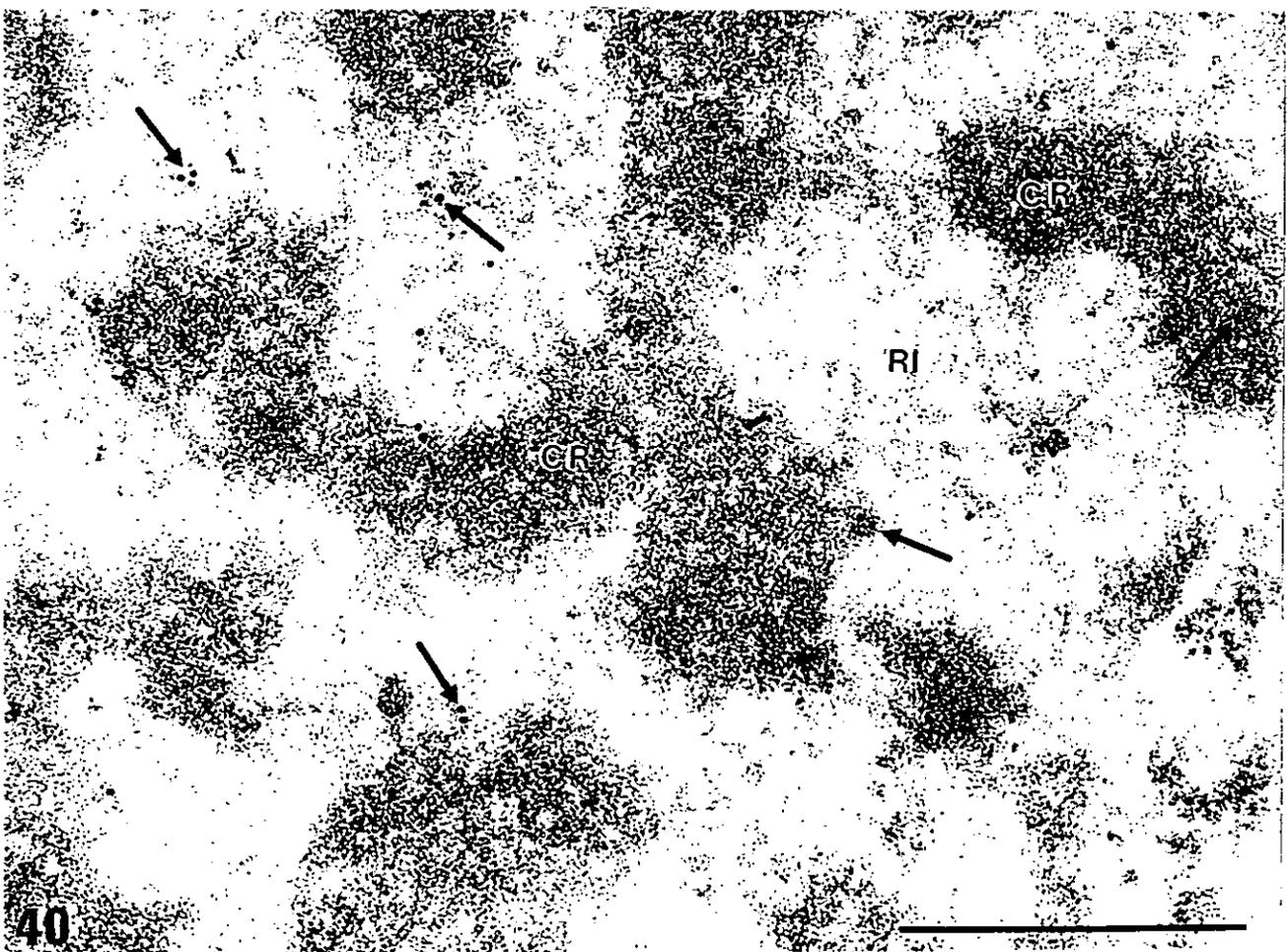
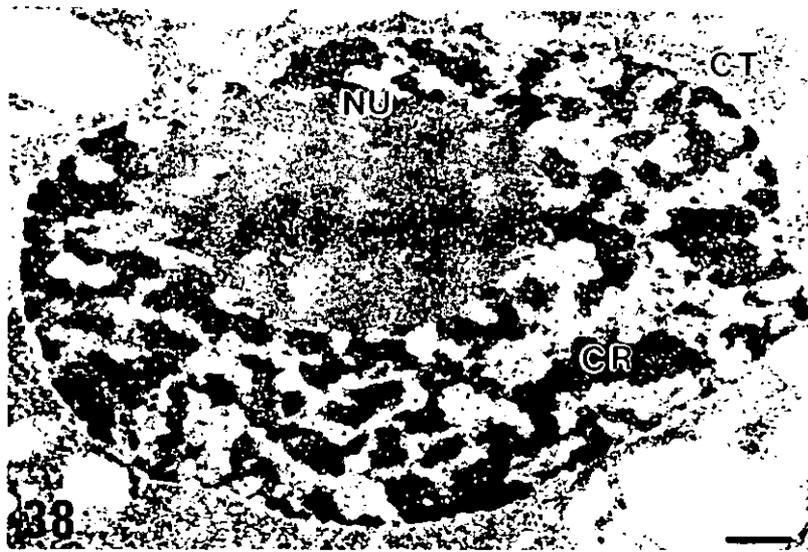
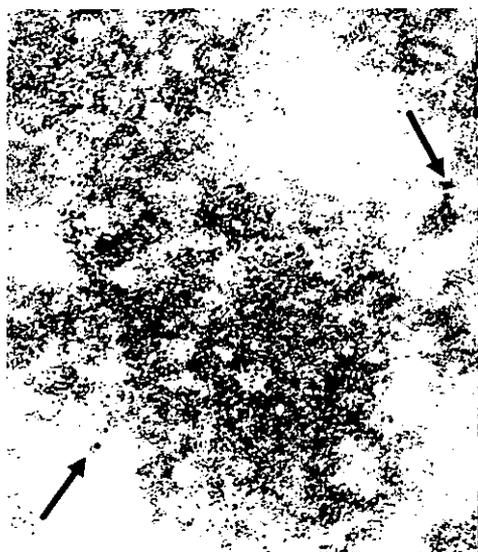
LÁMINA 17

Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.  
en fase S, en combinación con la citoquímica MA

Figuras 38 - 40

LÁMINA 17. Inmunomarcado con anti-PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S, en combinación con la citoquímica MA.

**Figuras 38, 39 y 40:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S. Inmunomarcado con anti-PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. En fase S (Fig. 38) el núcleo presenta una forma elíptica. El nucleolo (NU) es activo con numerosos y pequeños centros fibrilares de tipo homogéneo (áreas claras a los electrones en el interior nucleolar). El patrón de marcado (Figs. 39 y 40) es muy semejante al obtenido tras incorporación *in vivo* de BrdU (Lámina 14). Las partículas de oro (flechas) se localizan en fibras de cromatina descondensada de la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR). En figura 38, barra = 1  $\mu$ m. En figuras 39 y 40, barra = 0.5  $\mu$ m.



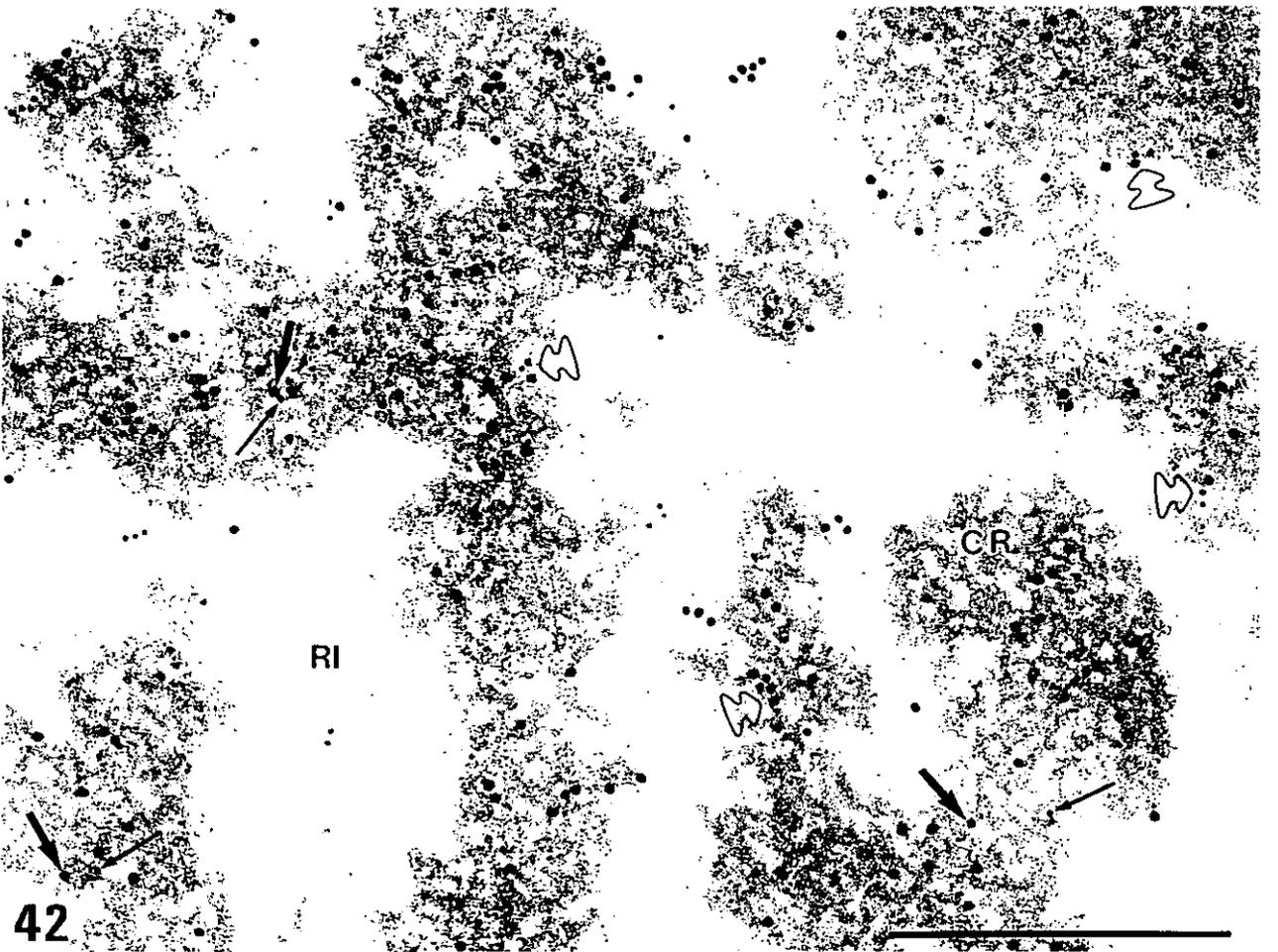
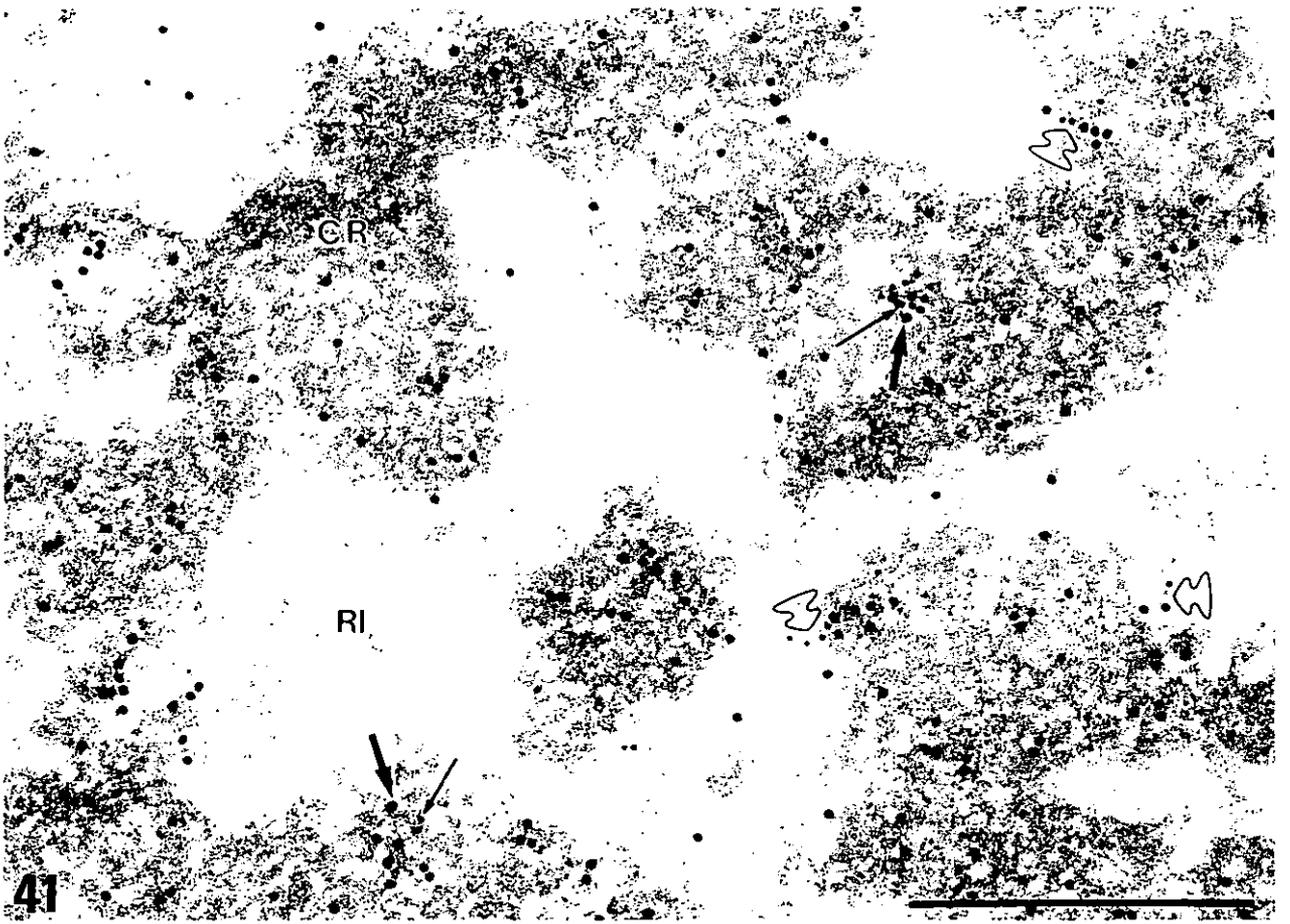
**LÁMINA 18**

Doble inmunolocalización de DNA y PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S, en combinación con la citoquímica MA.

Figuras 41 y 42

LÁMINA 18. Doble inmunolocalización de DNA y PCNA en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S<sub>1</sub> en combinación con la citoquímica MA.

**Figuras 41 y 42:** Regiones nucleares de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. en fase S. Doble inmunolocalización de DNA y PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro de 15 nm (flechas gruesas) localizan DNA y las de 10 nm (flechas finas) localizan PCNA. Las masas de cromatina condensada (CR) y algunas fibras de la región intercromatinica (RI) próximas a la cromatina condensada se marcan con anti-DNA. El inmunomarcado con anti-PCNA se localiza en fibras de la periferia de las masas de cromatina condensada. Frecuentemente se observan fibras (flechas abiertas) en las que ambos antígenos colocalizan. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 19**

Polen de *Capsicum annuum* L. en las fases de microspora vacuolada y bicelular  
joven. Tinción con DAPI.

Figuras 43 y 44

LÁMINA 19. Polen de *Capsicum annuum* L. en las fases de microspora vacuolada y bicelular joven. Tinción con DAPI.

**Figuras 43 y 44:** Cortes semifinos de anteras de *Capsicum annuum* L. que contienen microsporas vacuoladas y granos de polen bicelulares jóvenes. Tinción con DAPI. Observación bajo irradiación ultravioleta. El DAPI se une al DNA y produce una señal de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional al estado de condensación de la cromatina. Los núcleos de las microsporas vacuoladas (flechas abiertas) ocupan posiciones laterales y se observan diferentes intensidades de fluorescencia que representan distintos estados de condensación de la cromatina durante esta fase. En el polen bicelular los núcleos vegetativo (flechas largas) y generativo (flechas cortas) muestran un diferente patrón de cromatina. El núcleo generativo presenta una intensidad de fluorescencia más alta que en el vegetativo. Tapizando internamente el saco polínico se encuentra el Tapetum (TP), el tejido implicado en la nutrición del polen, formado por células binucleadas. La exina presenta fluorescencia inespecífica. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

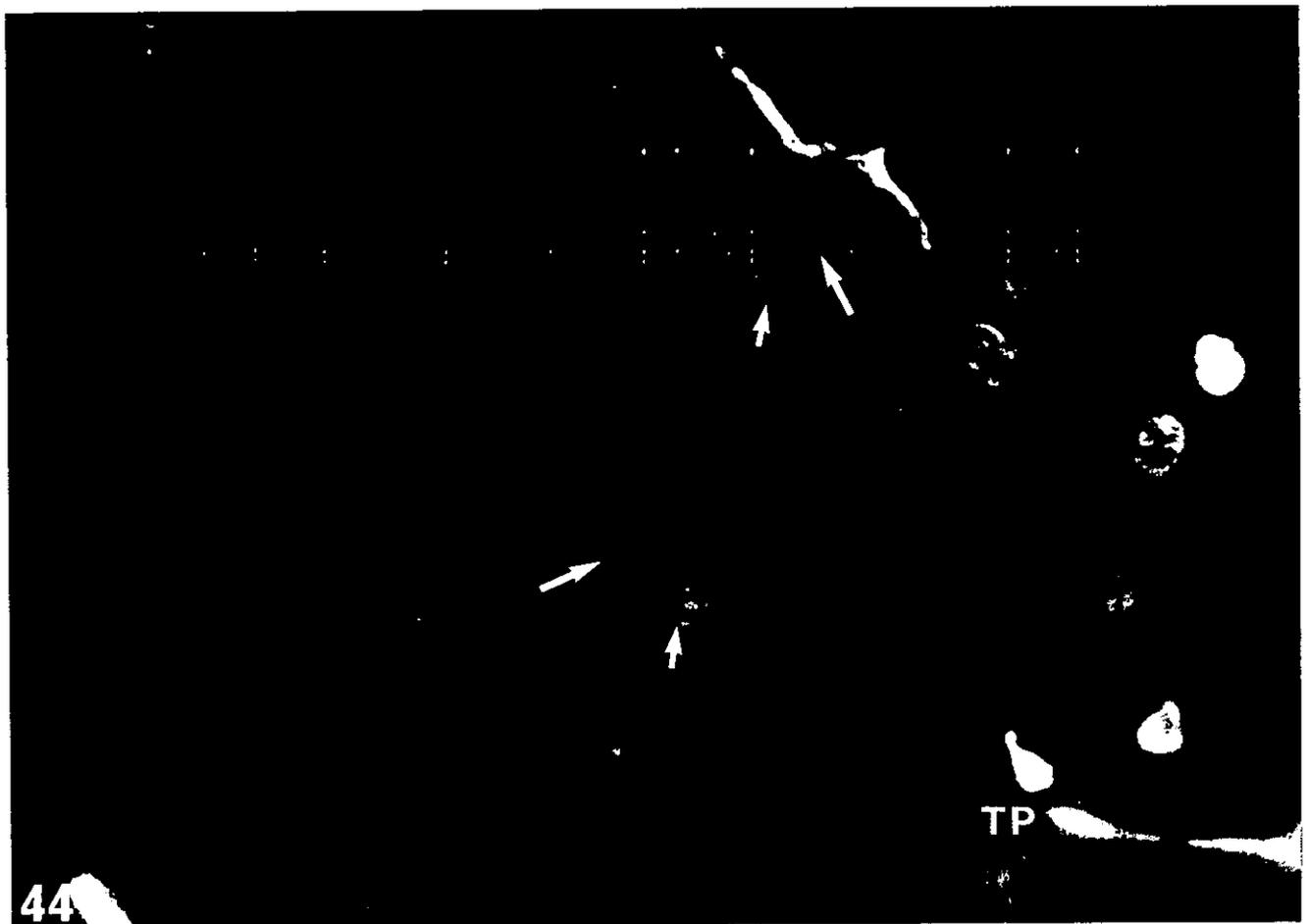
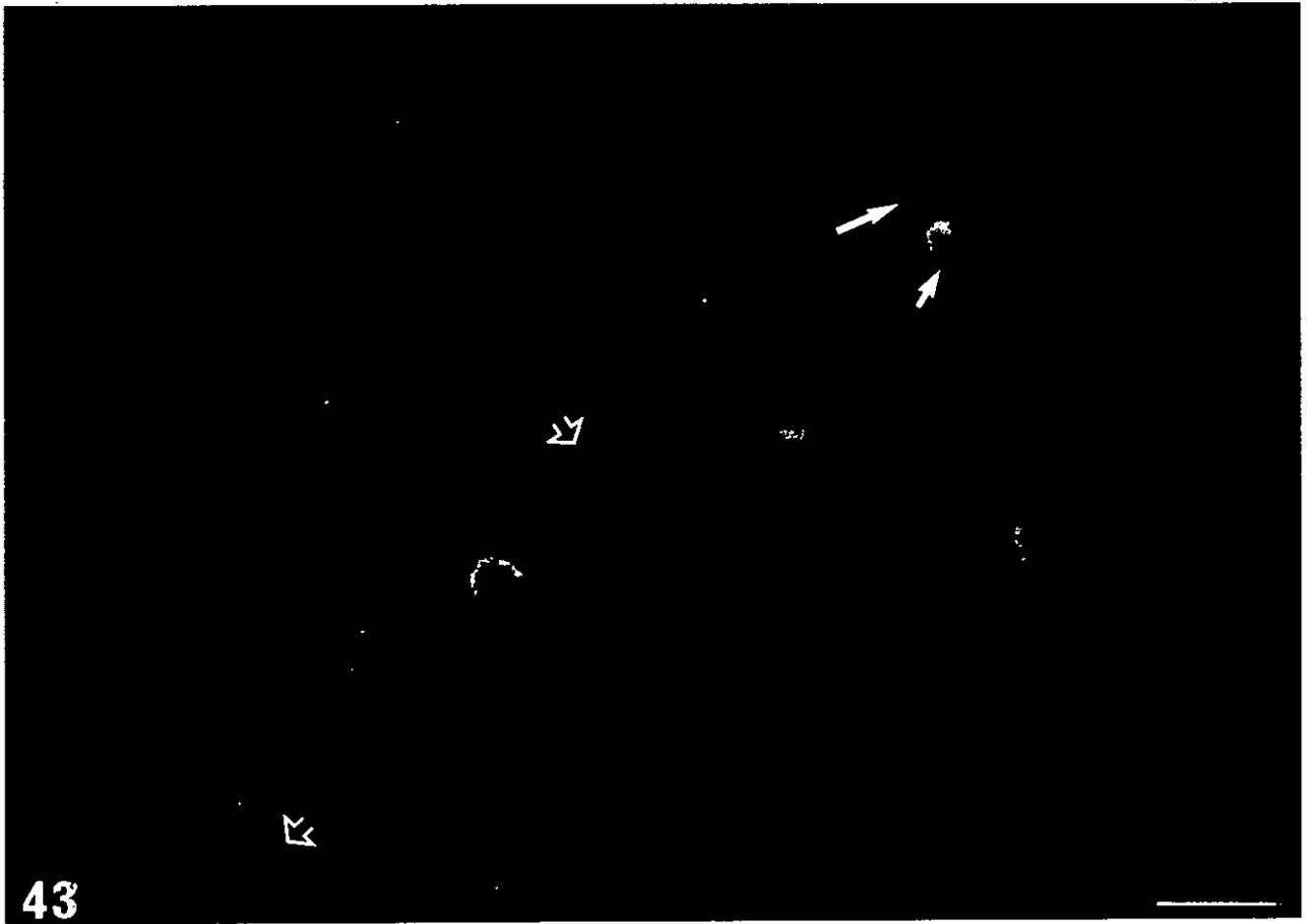


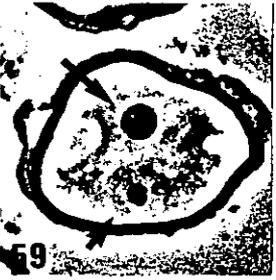
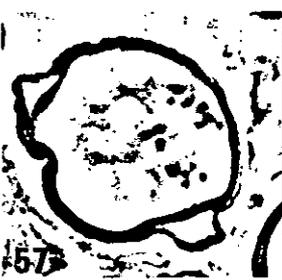
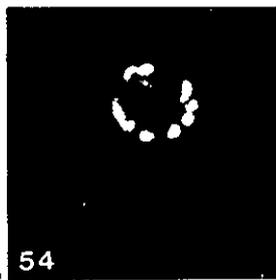
LÁMINA 20

*Desarrollo del polen desde la fase de microspora vacuolada a la de bicelular joven*

Figuras 45 - 64

LÁMINA 20. Desarrollo del polen desde la fase de microspora vacuolada a la de bicelular joven

**Figuras 45-64:** Desarrollo del polen desde la fase de microspora vacuolada a la de bicelular joven. Cortes semifinos. Citoquímica MA realizada en bloque y observación bajo contraste de fase (**Figs. 45-53 y 55-64**) y tinción con DAPI y observación bajo irradiación ultravioleta (**Fig. 54**). La fase de microspora vacuolada (**Figs. 45-51**) es muy dinámica. En ella se producen cambios en el estado de condensación de la cromatina. El núcleo ocupa una posición lateral debido a la presencia de una gran vacuola citoplásmica, que en estadios próximos a la mitosis se fragmenta dando lugar a pequeñas vacuolas. La forma del núcleo pasa de ser redondeada a elíptica a medida que se acerca a la mitosis. En profase la cromatina se condensa (**Figs. 52-55**) y el nucleolo, que aún está presente al comienzo de esta fase, se reabsorbe. En metafase (**Fig. 56**) los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial, situada entre la pared del polen y el tonoplasto. Tras anafase (**Fig. 57**) y telofase (**Fig. 58**) se forma el polen bicelular (**Figs. 59-64**) constituido por dos células, la vegetativa (flecha larga), de mayor tamaño, y la generativa (flecha corta), incluida en el citoplasma de la anterior. En estadios tempranos (**Figs. 56 y 60**) el patrón de condensación de la cromatina es semejante en los núcleos vegetativo y generativo, mientras que en fases posteriores (**Figs. 61-64**) es diferente, presentando el núcleo generativo un mayor grado de condensación de la cromatina. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



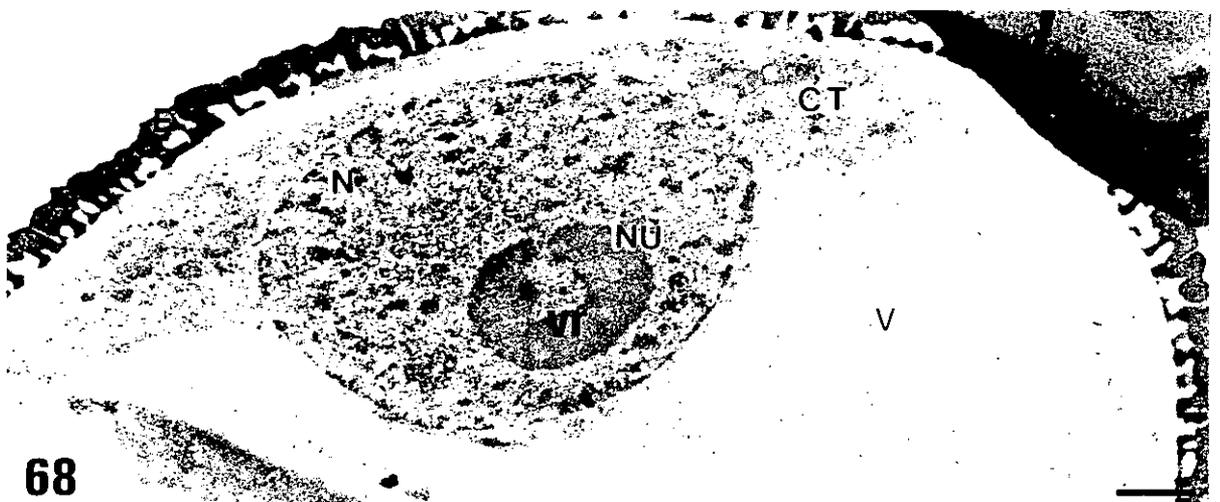
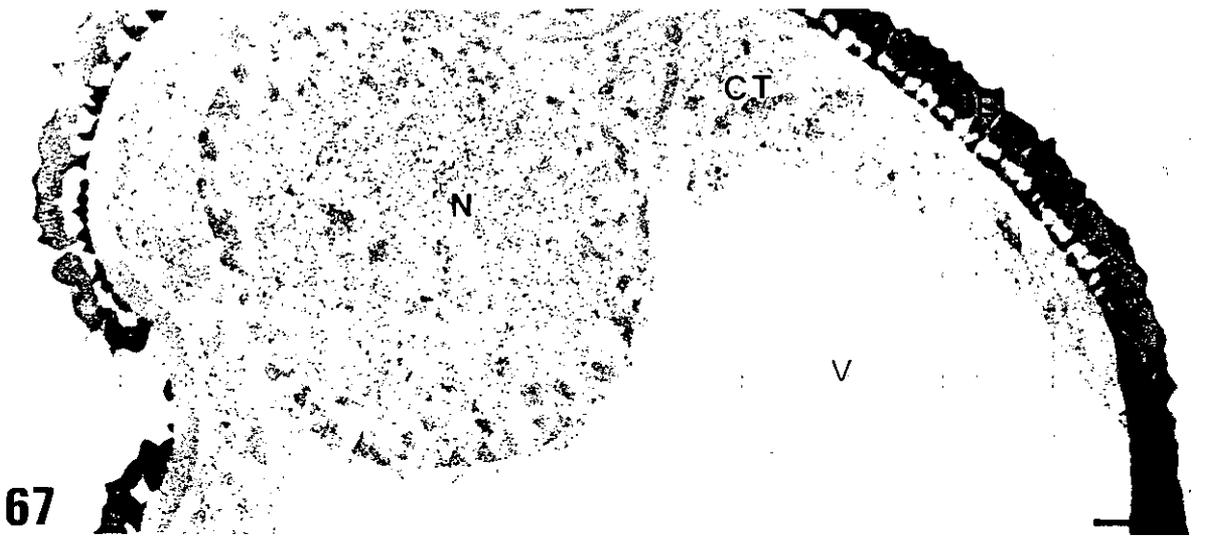
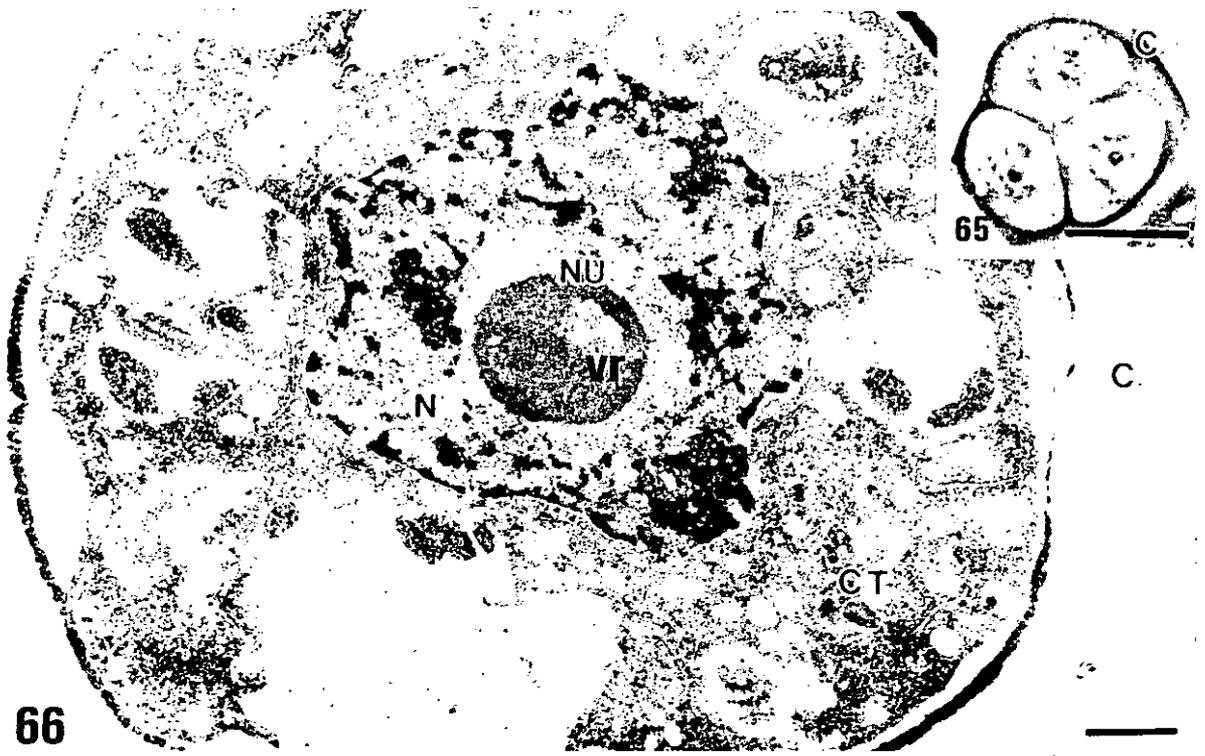
**LÁMINA 21**

Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fases de tetrada y  
*microspora vacuolada. Citoquímica MA*

Figuras 65 - 68

LÁMINA 21. Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fases de tetrada y microspora vacuolada. Citoquímica MA

**Figuras 65-68:** Cambios ultraestructurales en el núcleo durante la evolución del polen. Fases de tetrada (**Fig. 66**) y microspora vacuolada (**Figs. 67 y 68**). Citoquímica MA realizada en bloque. En la fase de tetrada (**Fig. 65**), una vez finalizada la meiosis, las microsporas jóvenes aún se mantienen juntas envueltas por la pared de calosa (C). El núcleo (N) (**Fig. 66**) ocupa una posición central y en él se observan dos patrones de condensación de la cromatina, resultado del proceso de descondensación que se inicia en G1. Esta fase se caracteriza por la presencia de grandes masas de cromatina condensada, principalmente en contacto con la envoltura nuclear, que coexisten con otras más pequeñas, dejando entre sí grandes espacios en la región intercromatínica. El nucleolo (NU) se encuentra en estado de reactivación, mostrando una característica gran vacuola de reactivación (VR). En estadios tempranos de la fase de microspora vacuolada (**Fig. 67**), el núcleo se desplaza lateralmente debido a la formación de una gran vacuola central (V) que ocupa la mayor parte del volumen celular. La forma del núcleo es redondeada y las masas de cromatina condensada son abundantes y de pequeño tamaño, situadas tanto en el interior como en la periferia nuclear. En un estadio posterior (**Fig. 68**) se mantienen estas características. El nucleolo presenta una vacuola de reactivación (**Fig. 68**). CT: Citoplasma. En Fig. 65, barra = 10  $\mu\text{m}$ . En Figs. 66-68, barra = 1  $\mu\text{m}$ .



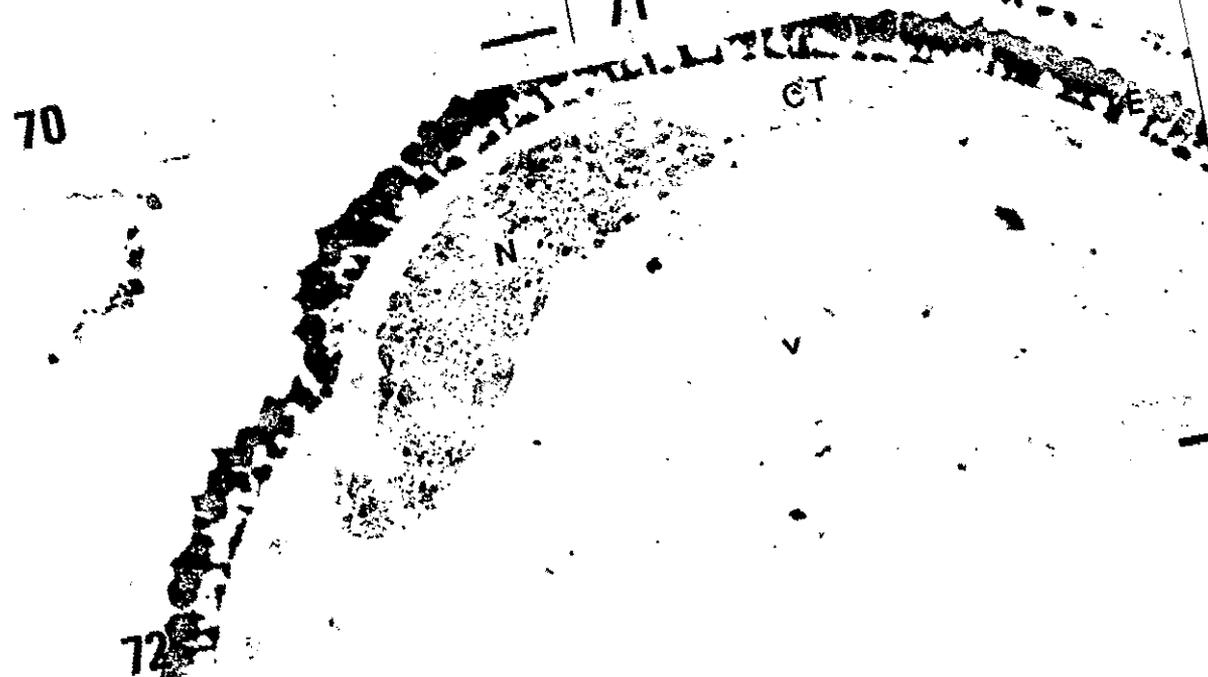
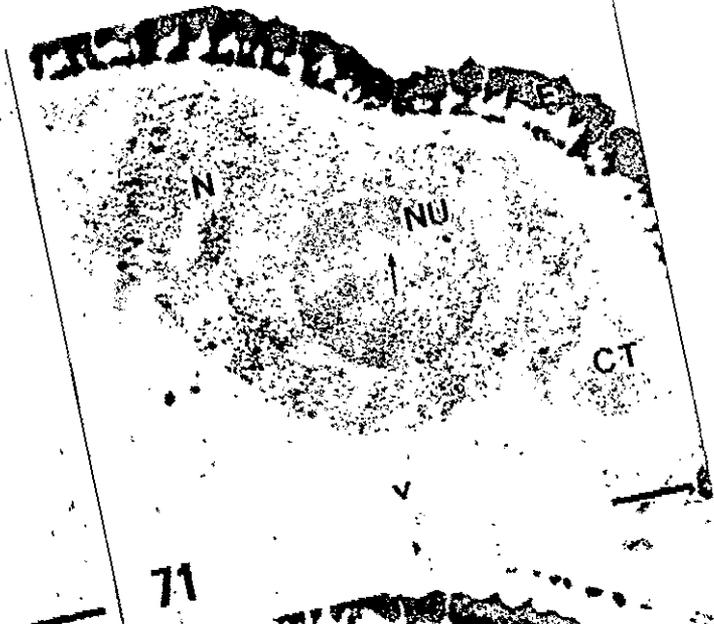
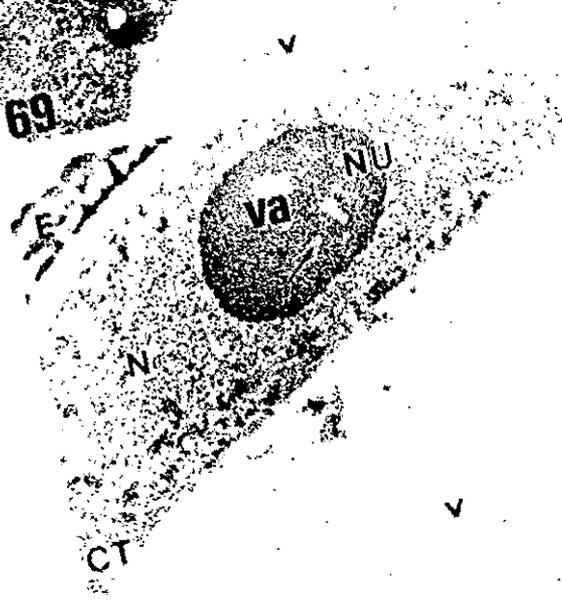
**LÁMINA 22**

*Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de microspora vacuolada. Citoquímica MA*

**Figuras 69 - 72**

LÁMINA 22. Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de microspora vacuolada. Citoquímica MA

**Figuras 69-72:** Cambios ultraestructurales en el núcleo durante la evolución del polen. Fase de microspora vacuolada. Citoquímica MA realizada en bloque. Después de su reactivación, el nucleolo (NU) (Fig. 69) en el final del estadio de núcleo con forma redondeada, se muestra activo, como indica la presencia de centros fibrilales de tipo homogéneo (flecha). Esta actividad se mantiene cuando la forma del núcleo pasa a ser elíptica (Fig. 70 y 71). En este estadio se observa la presencia de vacuolas de actividad (VA). En el periodo final de la interfase de la microspora vacuolada se aprecian cambios en el patrón de condensación de la cromatina, que experimenta un ciclo de descondensación (desde la Fig. 69 a la 71), para volver a condensarse cuando se acerca a profase (Fig. 72). En las vacuolas citoplásmicas se observan depósitos densos a los electrones. N: Núcleo; CT: Citoplasma; V: Vacuola citoplásmica. Barra = 1  $\mu$ m.



**LÁMINA 23**

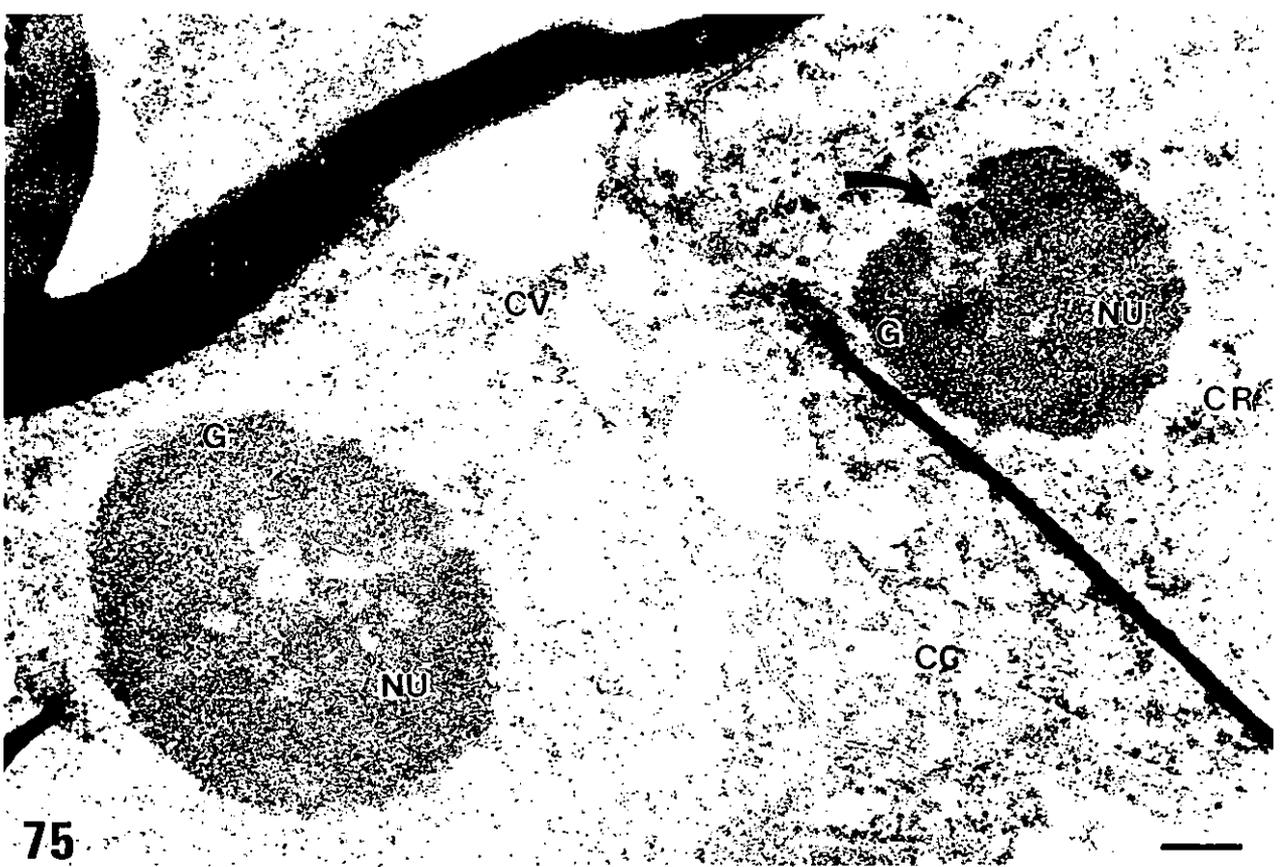
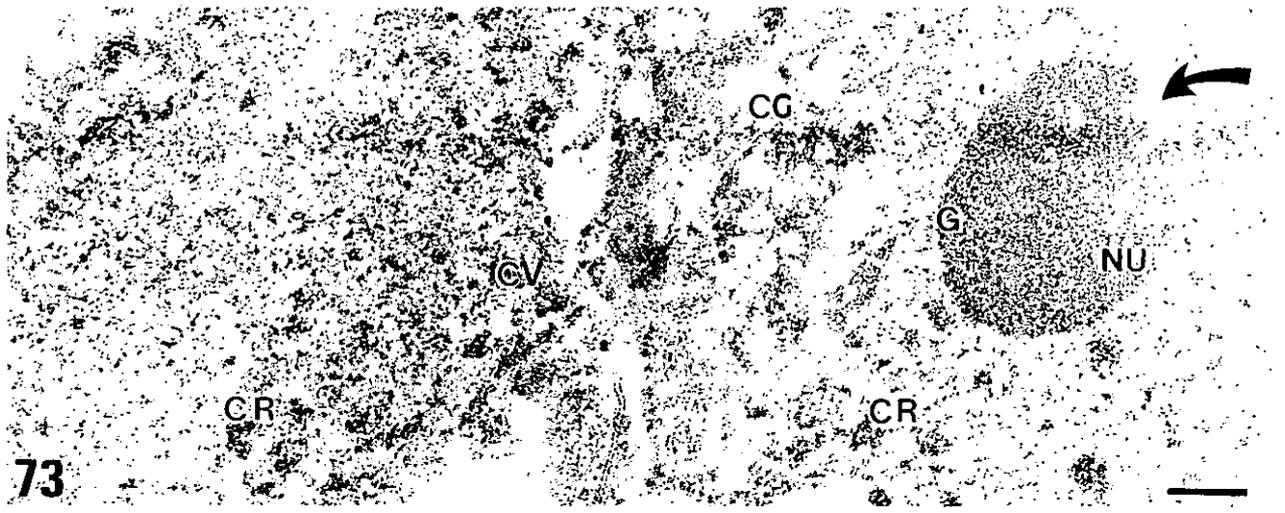
Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de polen  
bicelular joven. Citoquímica MA

Figuras 73 - 75

---

LÁMINA 23. Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de polen bicelular joven. Citoquímica MA

**Figuras 73-75:** Cambios ultraestructurales en el núcleo durante la evolución del polen. Fase de polen bicelular joven. Citoquímica MA realizada en bloque. En el polen bicelular recién formado (**Fig. 73**) el patrón de condensación de la cromatina es muy semejante en las células vegetativa y generativa. En ambos casos se observan abundantes masas de cromatina condensada (CR). En estadios posteriores (**Figs. 74 y 75**) la cromatina del núcleo vegetativo se descondensa mientras que la del núcleo generativo permanece condensada. La actividad nucleolar es baja en ambos núcleos en estos primeros estadios de la fase de polen bicelular joven, si bien el nucleolo (NU) vegetativo (**Figs. 74 y 75**) se muestra más activo como indica la mayor abundancia de componente granular (G) en relación al nucleolo generativo (**Figs. 73 y 75**). En éste se observa la entrada del organizador nucleolar (flecha curva), que forma un gran centro fibrilar heterogéneo en el interior del nucleolo. En la periferia se observa una fina capa de material granular. CV: Célula vegetativa; CG: Célula generativa; E: Exina. Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



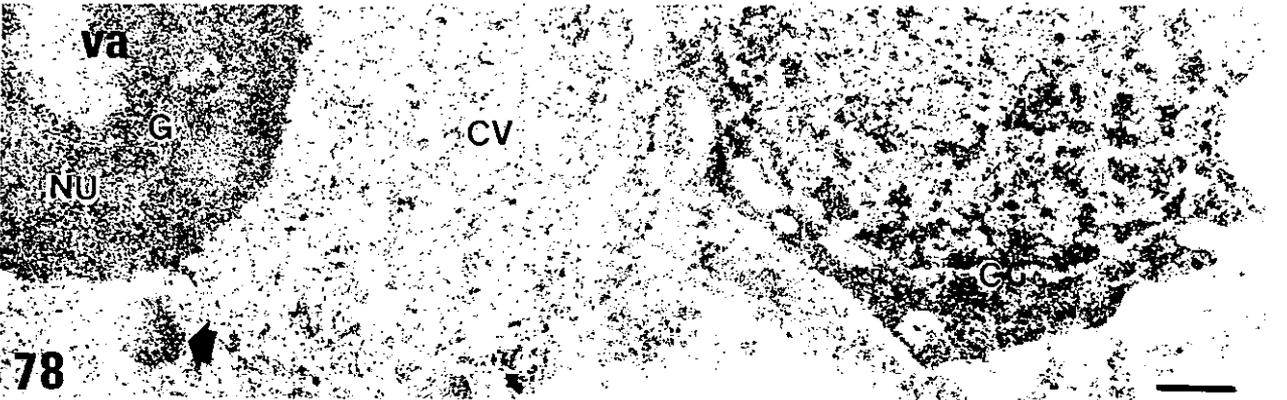
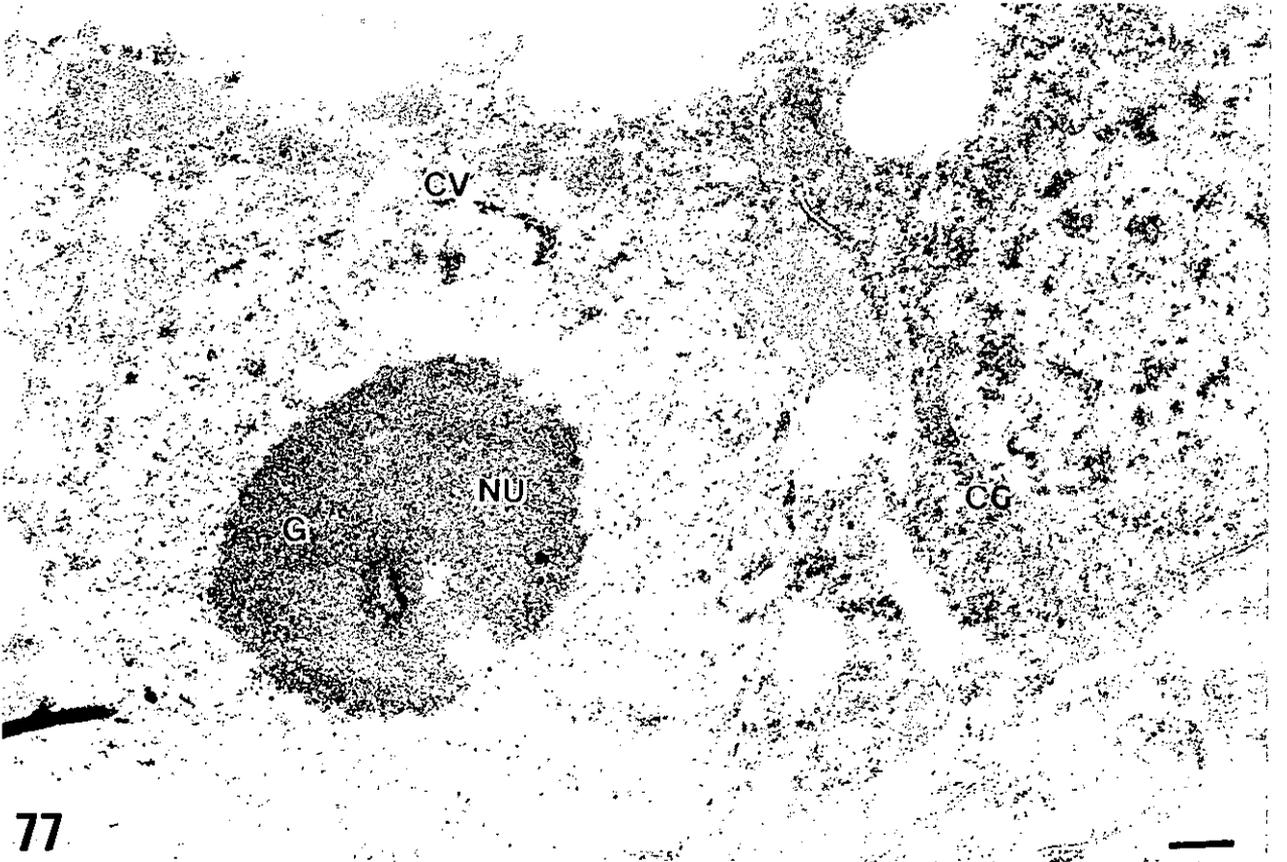
**LÁMINA 24**

Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de polen bicelular joven. Citoquímica MA

**Figuras 76 - 78**

LÁMINA 24. Ultraestructura nuclear durante la evolución del grano de polen. Fase de polen bicelular joven. Citoquímica MA

**Figuras 76-78:** Cambios ultraestructurales en el núcleo durante la evolución del polen: Fase de polen bicelular joven. Citoquímica MA realizada en bloque. El patrón de condensación de la cromatina es claramente diferente en los núcleos vegetativo y generativo. El núcleo generativo se caracteriza por la presencia de abundantes masas de cromatina condensada mientras que en el vegetativo la cromatina está más dispersa (Figs. 76-78). El nucleolo vegetativo (Figs. 76-78) se activa, mostrando una imagen típica de actividad con la presencia de una gran vacuola de actividad (VA) (Fig. 78). Se observan cuerpos nucleares (flechas gruesas) en la proximidad de los nucleolos vegetativos. El nucleolo generativo (Fig. 76) mantiene una baja actividad, como en estadios anteriores, mostrando una morfología compacta. CV: Célula vegetativa; CG: Célula generativa; E: Exina; G: Componente granular; Flecha curva: entrada del organizador nucleolar. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 25**

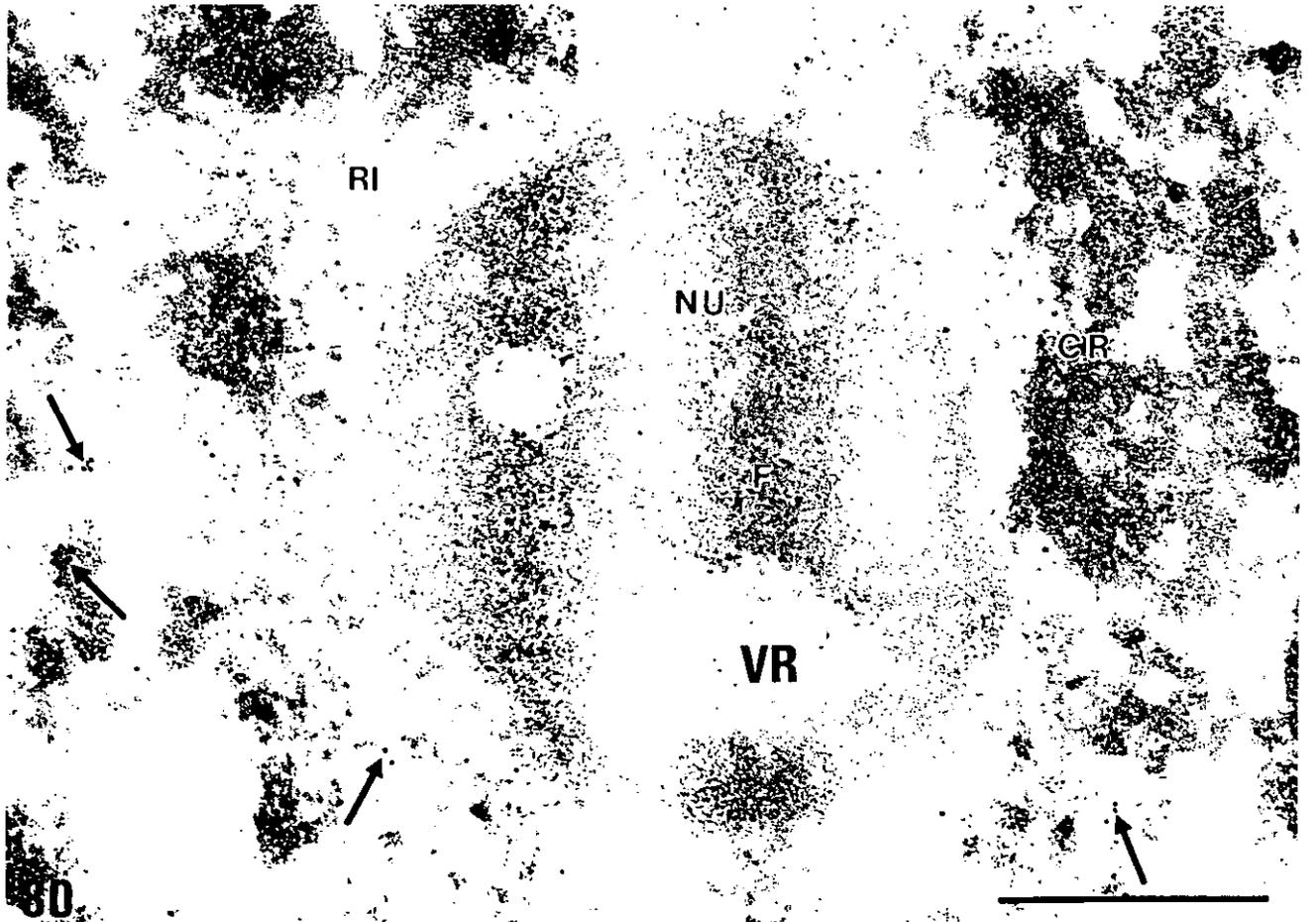
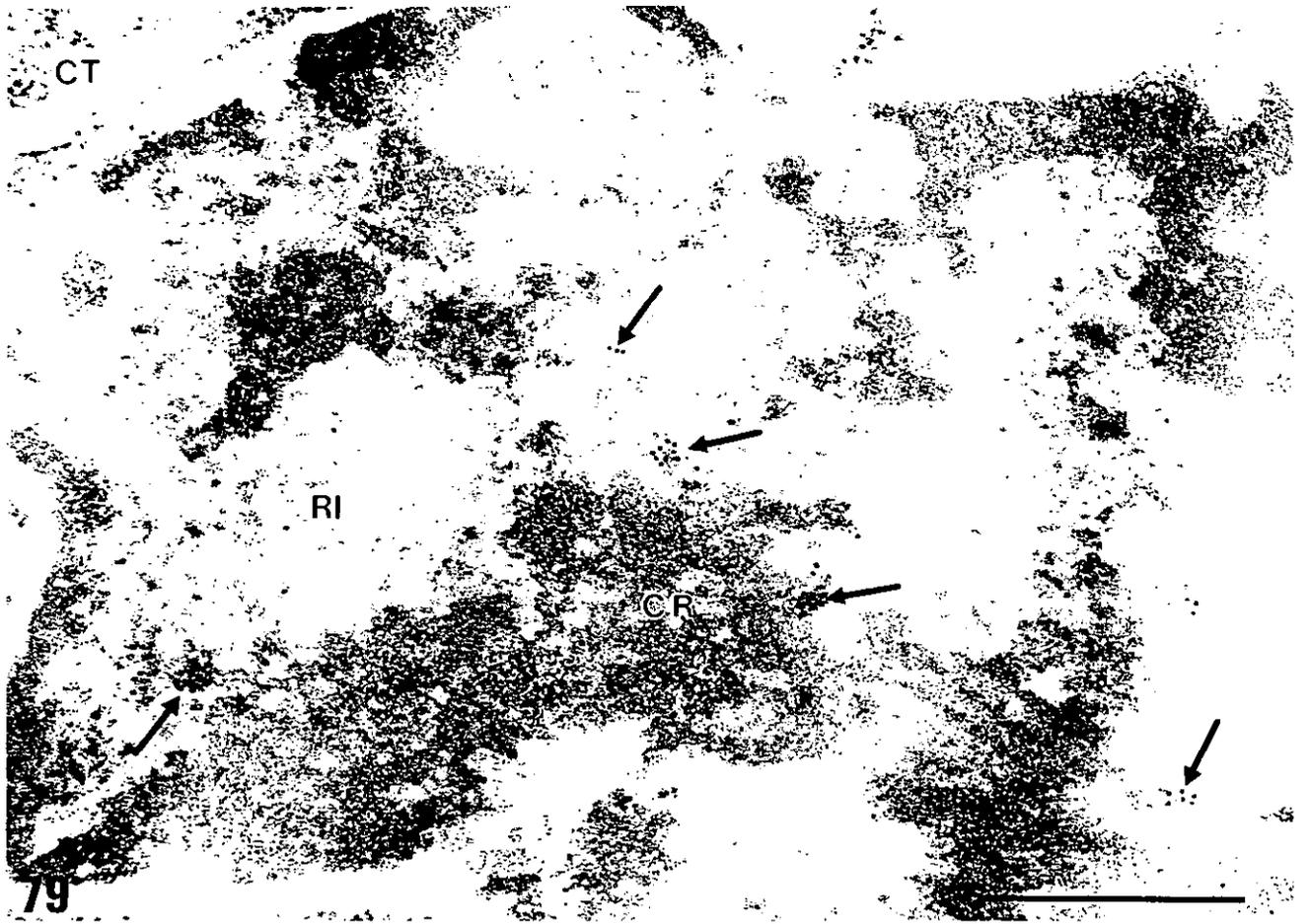
Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de tetrad

Figuras 79 y 80

---

LÁMINA 25. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de tetrada

**Figuras 79 y 80:** Regiones nucleares de microsporas jóvenes de *Capsicum annuum* L. en la fase de tetrada. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El marcado aparece en forma de partículas de oro aisladas en el nucleoplasma y en pequeños grupos (flechas) localizados en fibras de la región intercromatínica (RI) situadas en la periferia de las masas de cromatina condensada (CR). El nucleolo (NU) (Fig. 80) se encuentra en fase de reactivación, mostrando una vacuola de reactivación (VR) que contiene gránulos semejantes a los pericromatínicos. Algunas partículas de oro aisladas se localizan en el componente fibrilar denso (F) del nucleolo. El citoplasma (CT) está libre de marcado. Barra = 0.5  $\mu$  m.



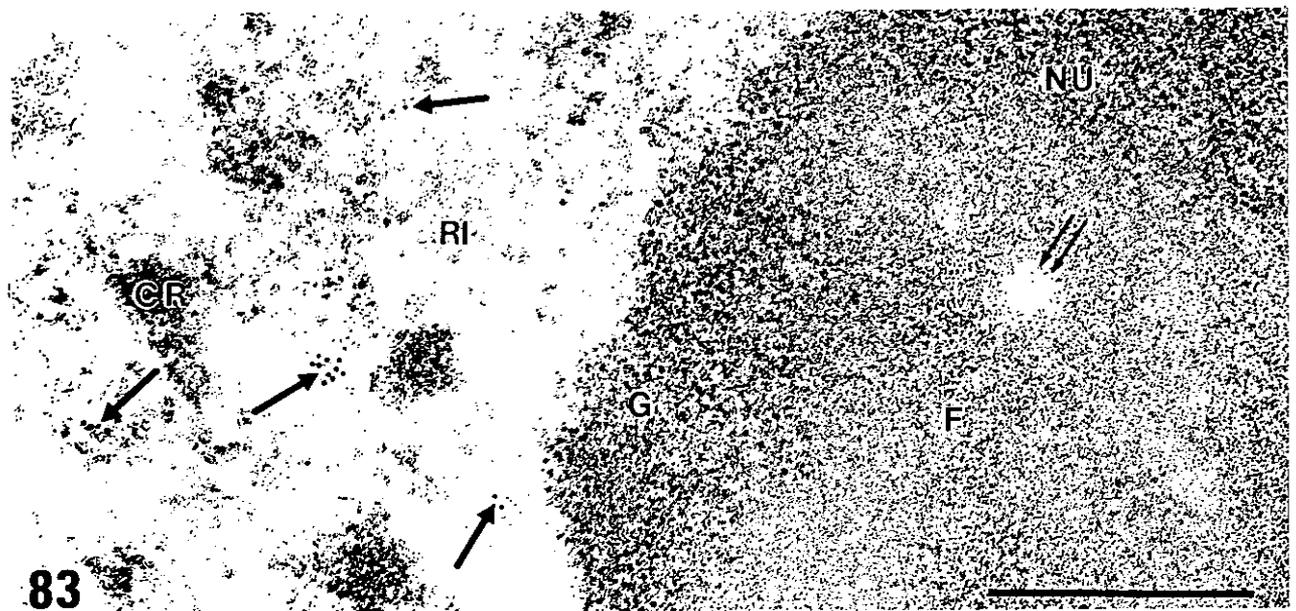
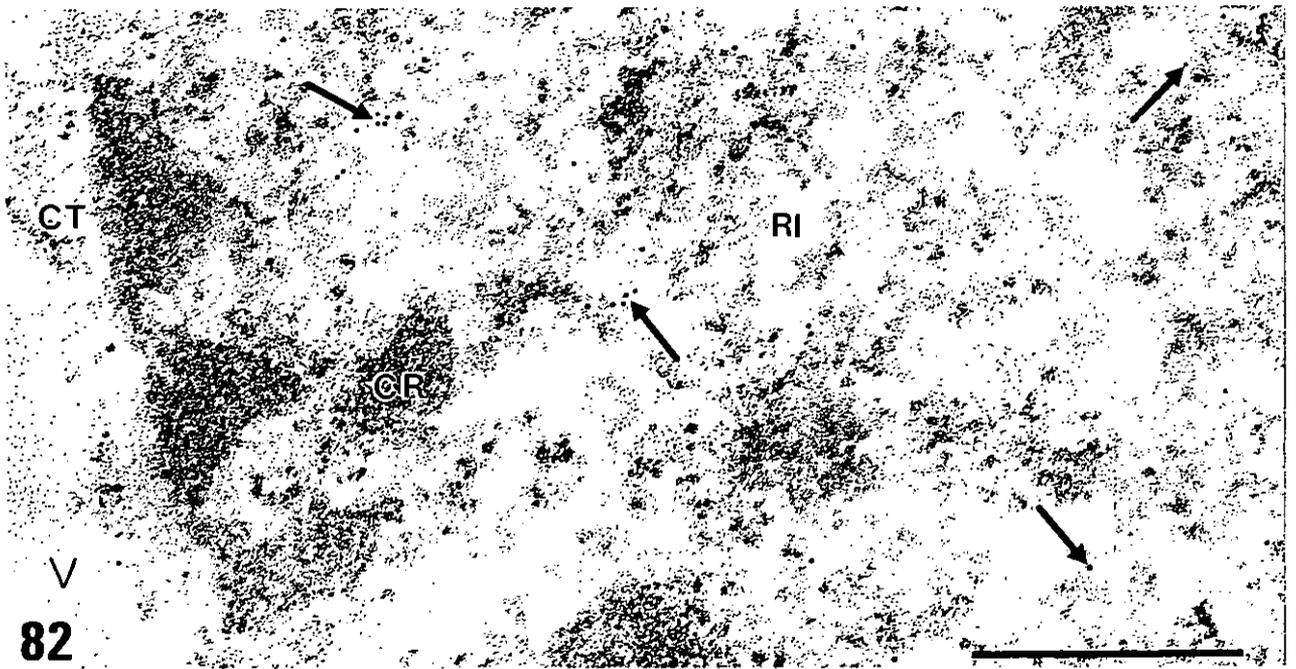
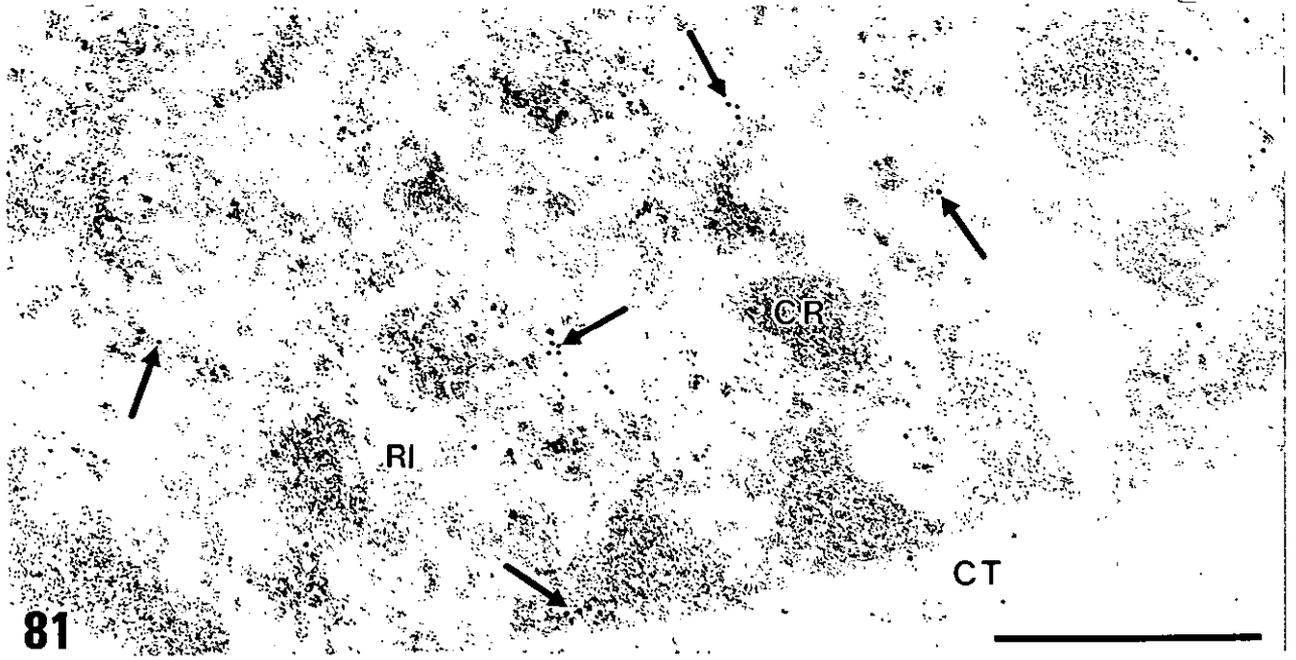
**LÁMINA 26**

Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de  
microspora vacuolada

Figuras 81- 83

LÁMINA 26. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de microspora vacuolada

**Figuras 81-83:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El marcado (flechas) se localiza en el interior del núcleo, bien en el nucleoplasma como partículas de oro aisladas, o bien agrupado en la periferia de las masas de cromatina condensada (CR) y sobre fibras de cromatina decondensada de la región intercromatínica (RI). En estos estadios de desarrollo de la microspora vacuolada (correspondientes a los mostrados en las figuras 67, 68 y 69, respectivamente) se observan pequeñas masas de cromatina condensada en contacto con la envoltura nuclear y en el interior del núcleo. El nucleolo (NU) (Fig. 83) está activo: el componente granular (G) está entremezclado con el fibrilar denso (F) y aparecen centros fibrilares de tipo homogéneo (doble flecha). El citoplasma (CT) y las vacuolas citoplásmicas (V) están prácticamente libres de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



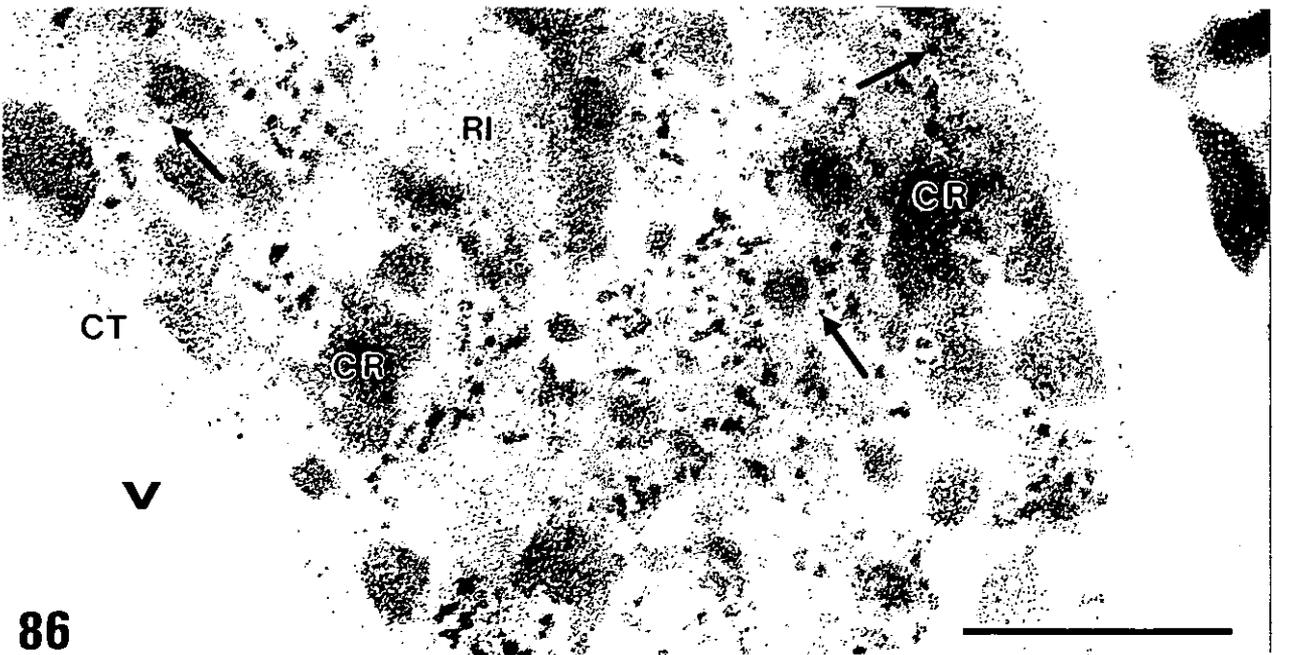
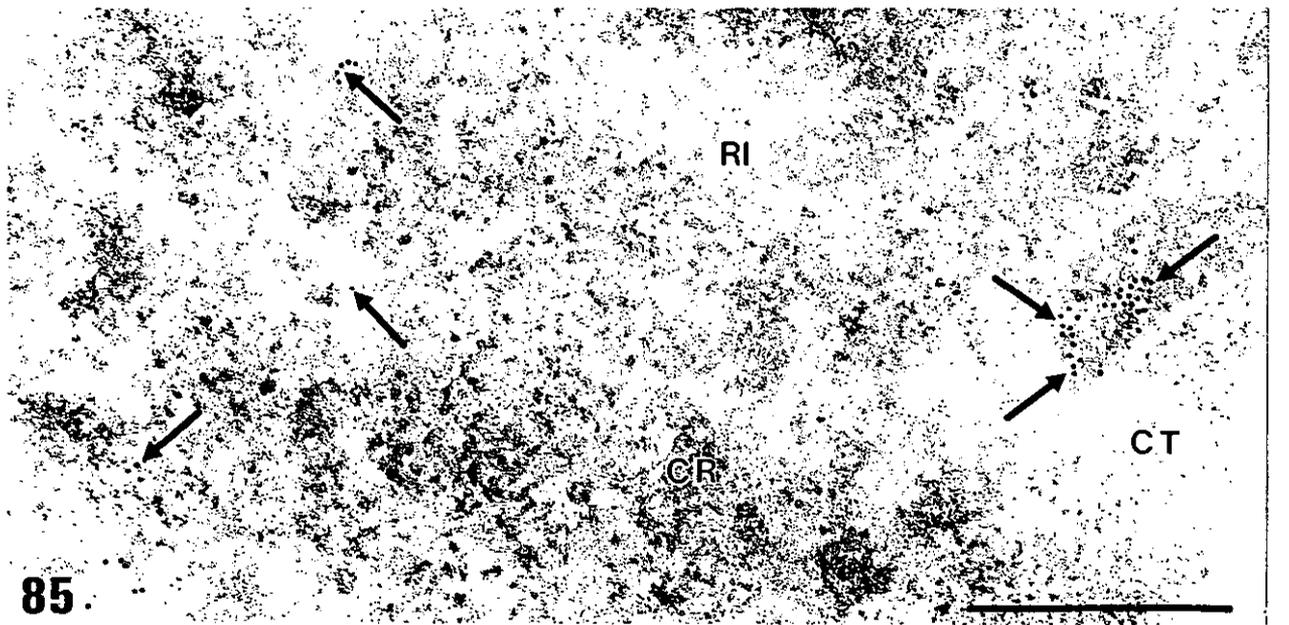
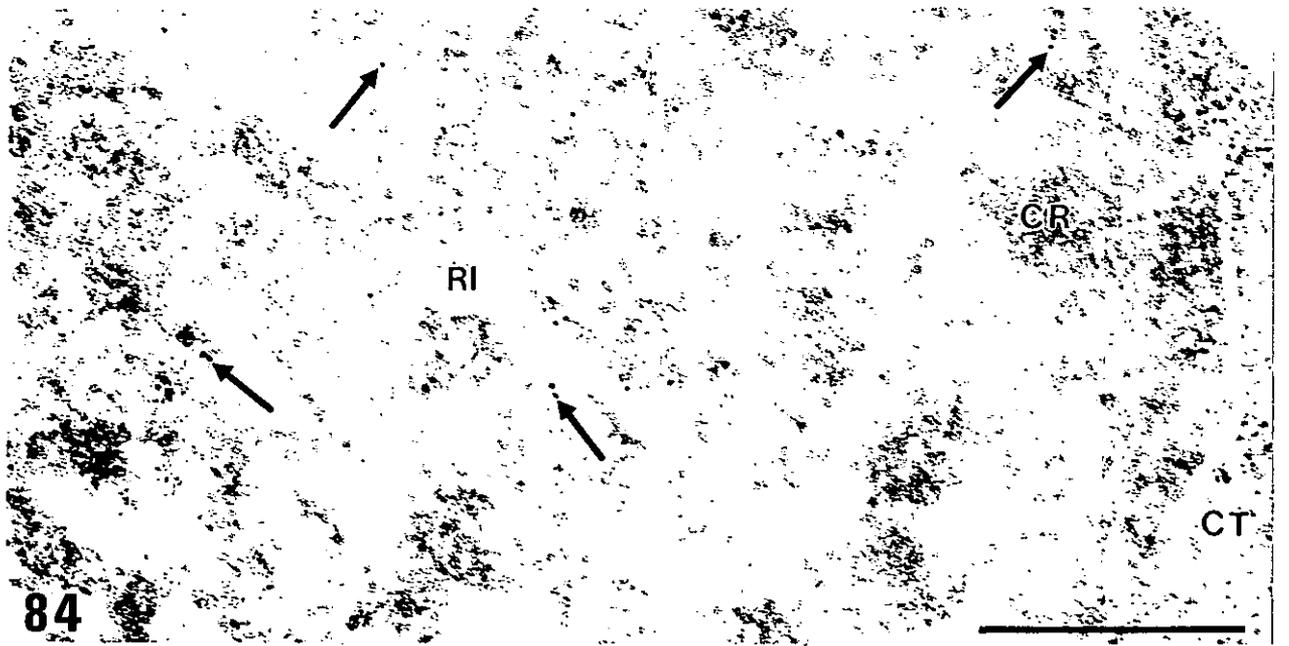
**LÁMINA 27**

Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de microspora vacuolada

Figuras 84 - 86

LÁMINA 27. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de microspora vacuolada

**Figuras 84-86:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. En los estadios finales de la interfase de la microspora vacuolada (correspondientes a los mostrados en las figuras 70, 71 y 72, respectivamente), la intensidad del marcado en el interior del núcleo decae (**Fig.84**). Posteriormente el marcado aumenta y aparece asociado a las masas de cromatina condensada (CR) en contacto con la envoltura nuclear (**Fig. 85**). El marcado es muy escaso cuando la microspora se aproxima a profase (**Fig. 86**). La cromatina está más dispersa (**Figs. 84 y 85**) que en los estadios anteriores (ver figuras 81 a 83), y se vuelve a condensar al comienzo de la profase (**Fig. 86**). El citoplasma (CT), vacuola citoplásmica (V) y exina (E), están libres de marcado. Barra = 0.5  $\mu$ m.



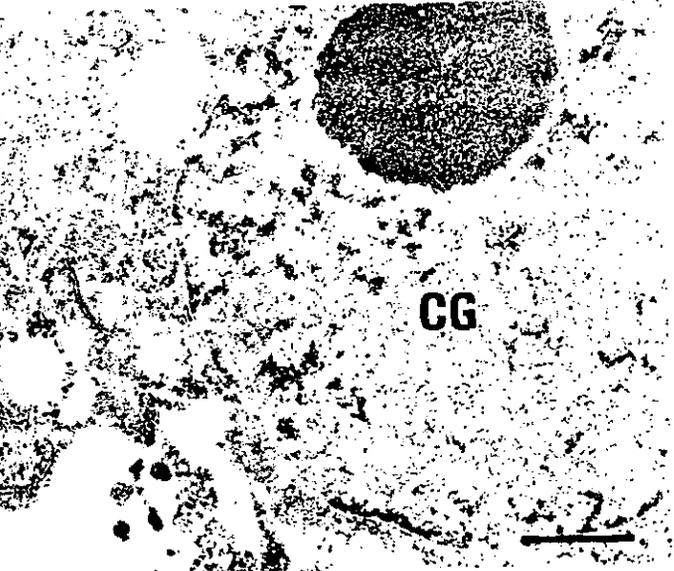
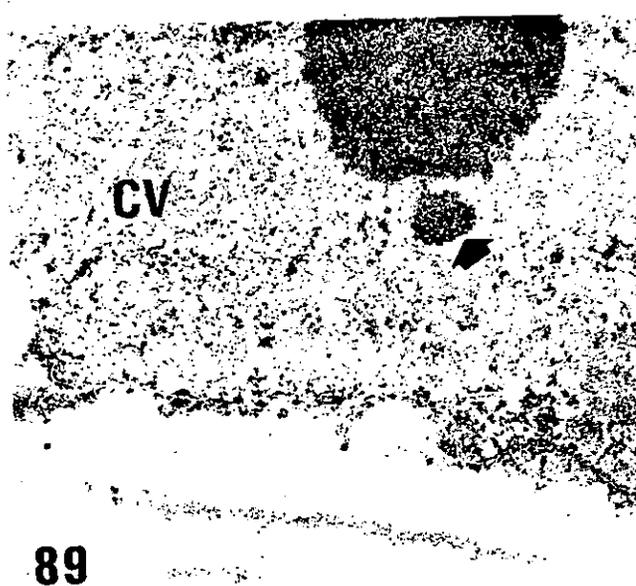
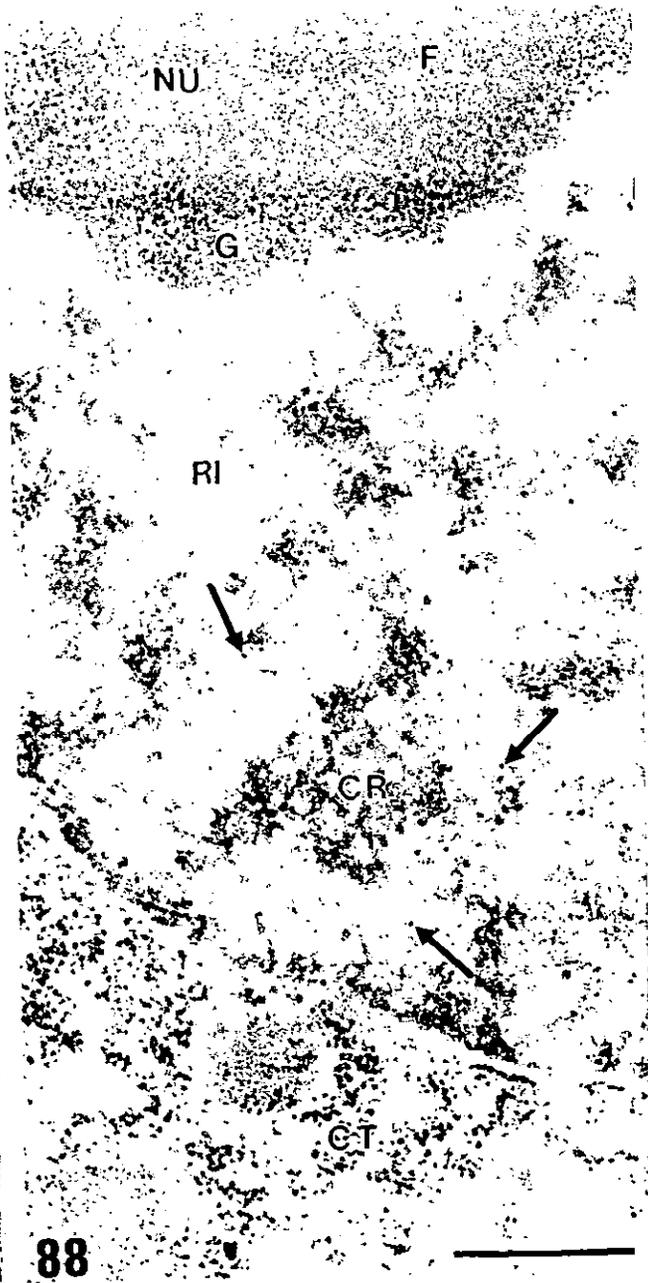
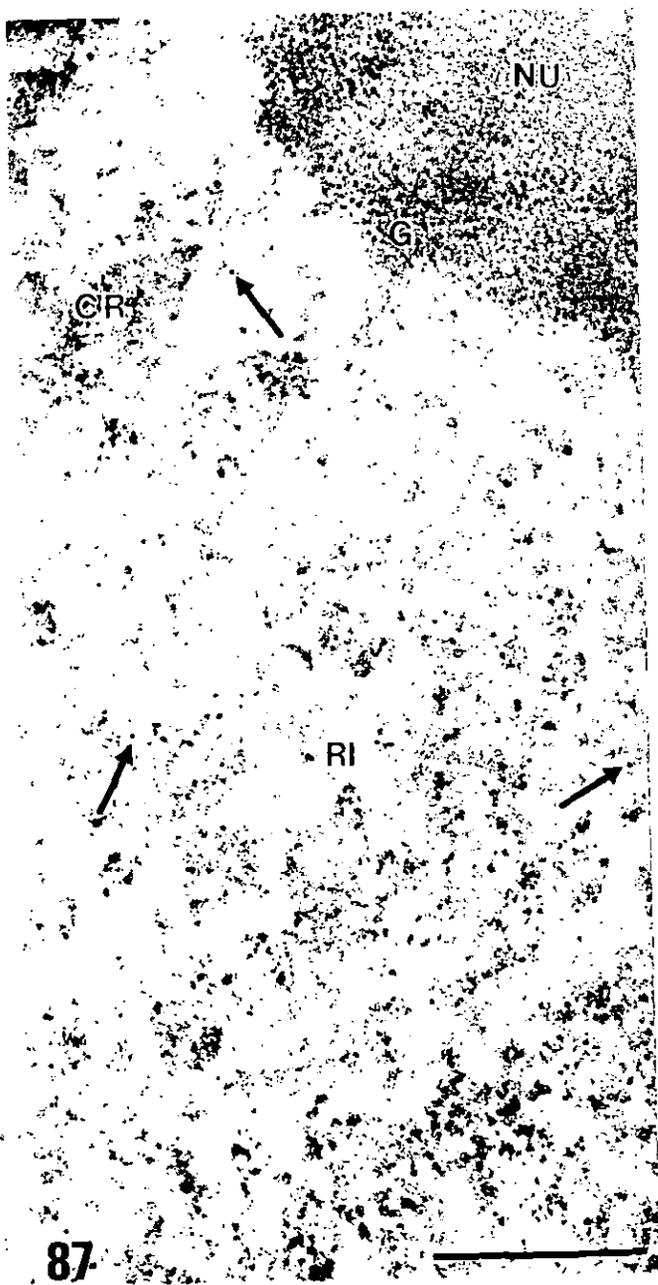
**LÁMINA 28**

Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen bicelular joven

Figuras 87- 89

LÁMINA 28. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen bicelular joven

**Figuras 87-89:** Regiones nucleares de las células vegetativa (Fig. 87) y generativa (Fig. 88) de polen bicelular joven (Fig. 89) de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El marcado es escaso. Las partículas de oro (flechas) aparecen aisladas en el nucleoplasma, tanto en la célula vegetativa (CV) como en la generativa (CG). No se observan grupos de partículas de oro. En esta fase temprana del desarrollo del polen bicelular (Fig. 89) la organización nuclear en las células vegetativa y generativa es distinta. El núcleo vegetativo (Fig. 87) se caracteriza por un patrón de cromatina disperso, mientras que en el generativo (Fig. 88) hay abundantes masas de cromatina condensada. En el nucleolo (NU) vegetativo (Fig. 87) el componente granular (G) es abundante y se entremezcla con el fibrilar denso (F). En el núcleo vegetativo se observa un cuerpo nuclear (flecha gruesa). La célula generativa es poco activa. El nucleolo se compone principalmente de componente fibrilar denso y se observa una fina capa de componente granular en su periferia. El citoplasma (CT) está libre de marcado anti-PCNA. En la vacuola citoplásmica se observan depósitos densos (Fig. 89). En figs. 87 y 88, barra = 0.5  $\mu\text{m}$ . En fig. 89, barra = 1  $\mu\text{m}$ .



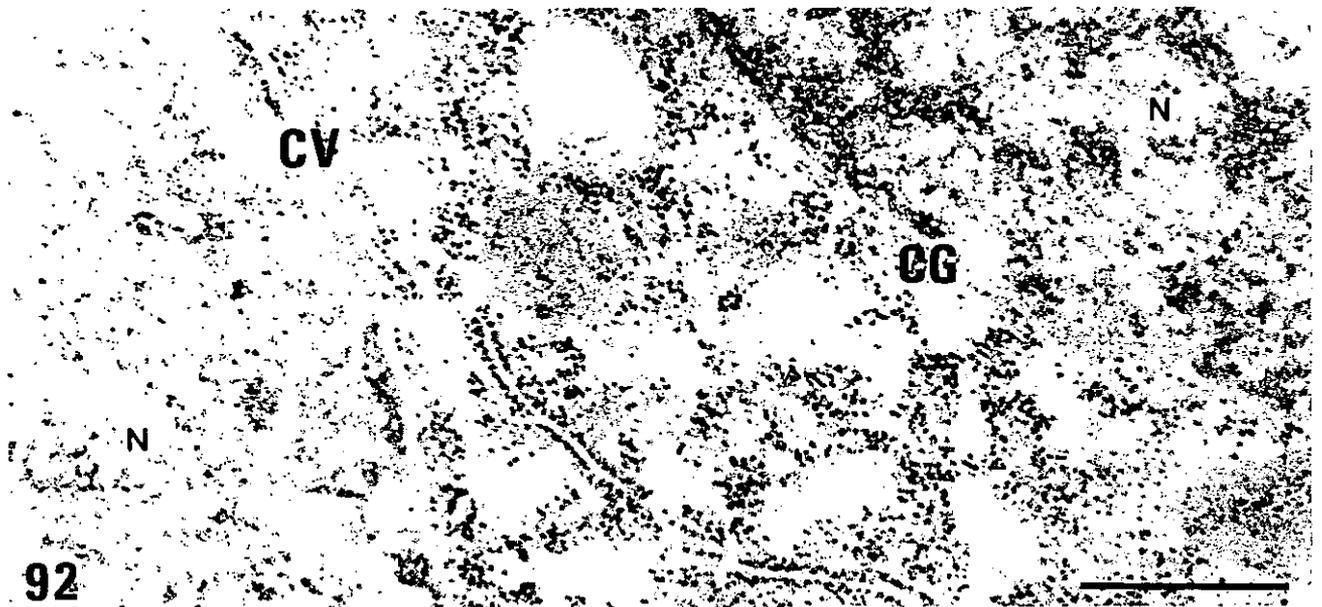
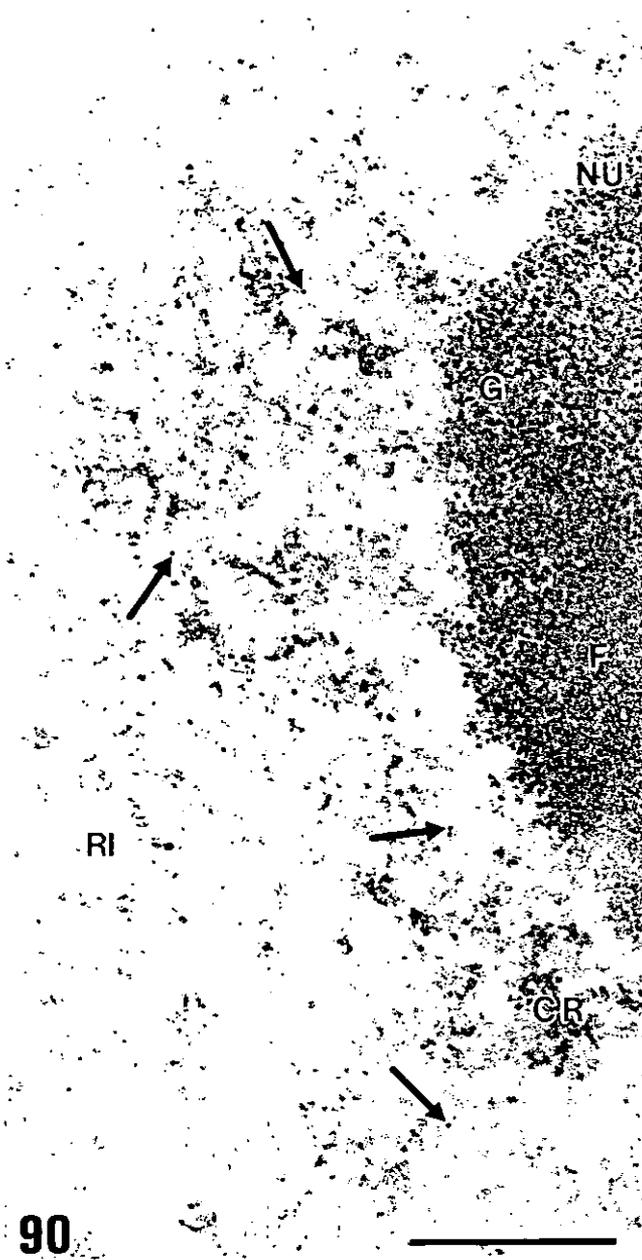
**LÁMINA 29**

Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen  
bicelular joven

Figuras 90 - 92

LÁMINA 29. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen bicelular joven

**Figuras 90-92:** Regiones nucleares de las células vegetativa (Fig. 90) y generativa (Fig. 91) de polen bicelular joven (Fig. 92) de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El marcado es escaso. Las partículas de oro (flechas) aparecen aisladas en el nucleoplasma, tanto en la célula vegetativa (CV) (Figs. 90) como en la generativa (CG) (Figs. 91). No se observan grupos de partículas de oro. Se aprecian claras diferencias en el estado de condensación de la cromatina entre las células vegetativa y generativa (Figs. 90-92). En esta última aparecen abundantes masas de cromatina condensada (CR). El citoplasma (CT) está prácticamente libre de marcado. Barra = 0.5  $\mu$ m.



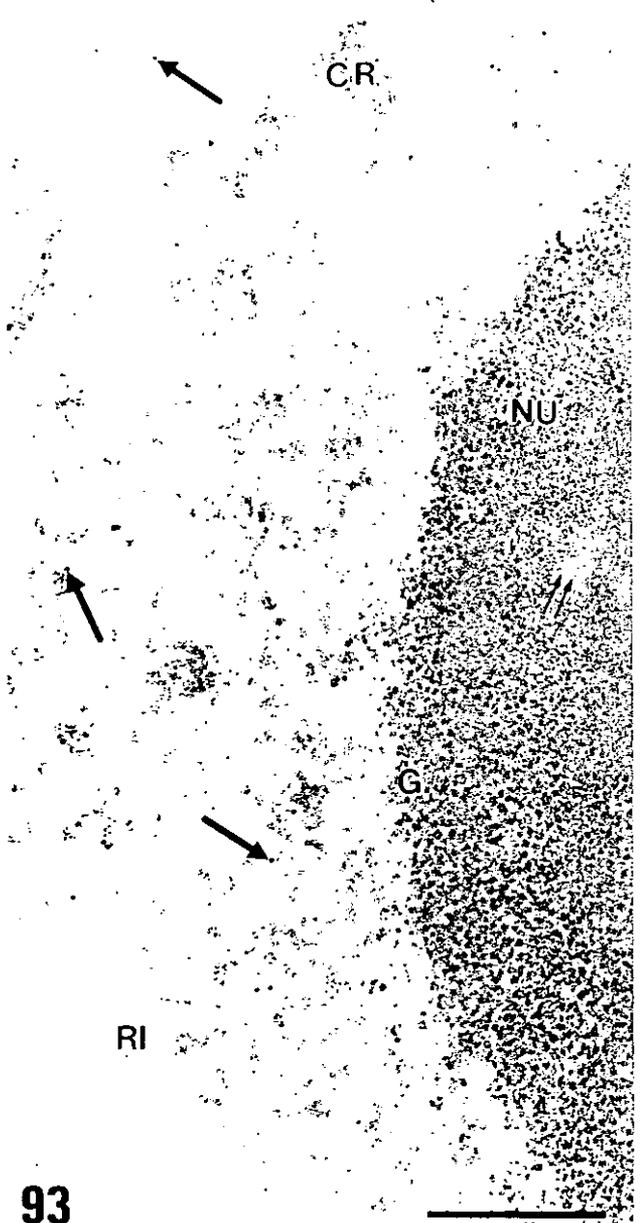
**LÁMINA 30**

Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen bicelular joven

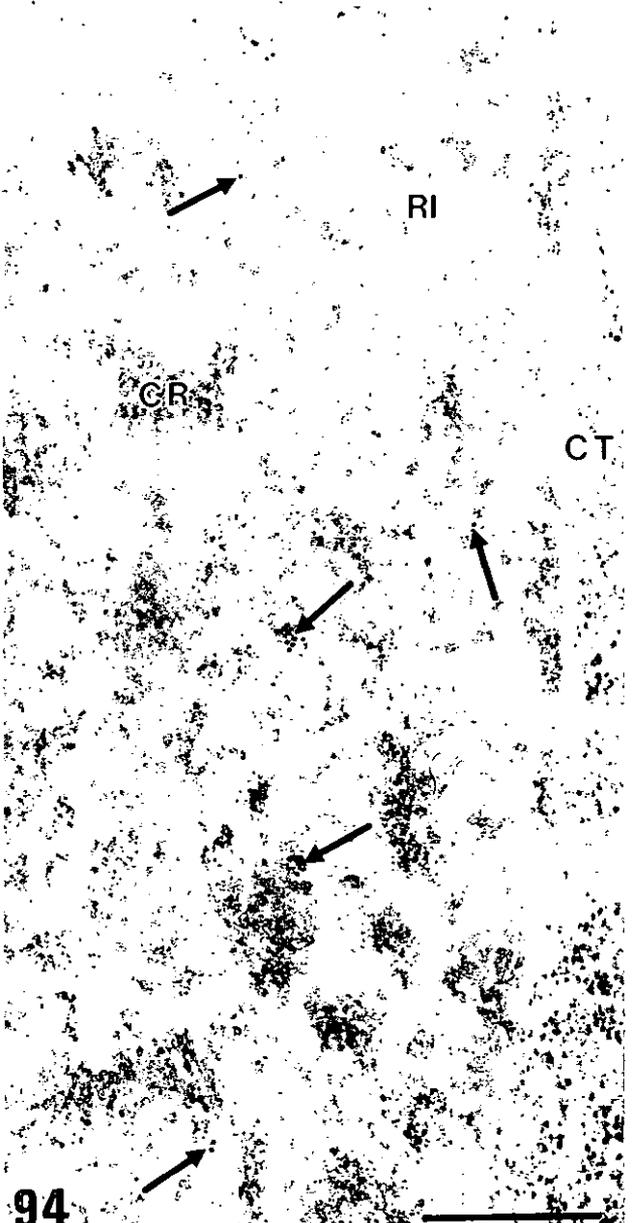
Figuras 93 - 95

LÁMINA 30. Inmunolocalización de PCNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de polen bicelular joven

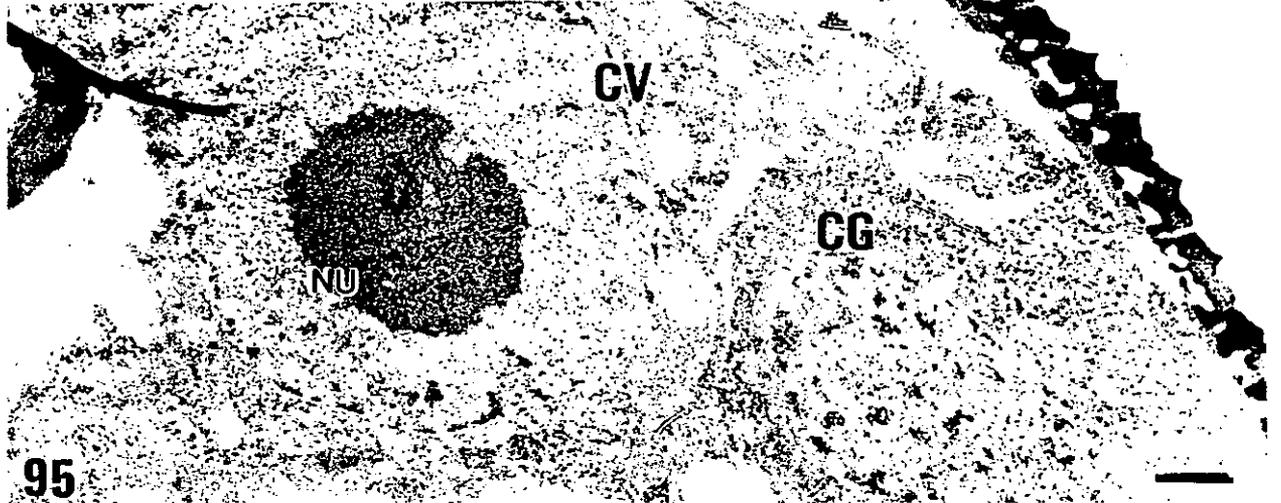
**Figuras 93-95:** Regiones nucleares de las células vegetativa (**Fig. 93**) y generativa (**Fig. 94**) de polen bicelular joven (**Fig. 95**) de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de PCNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El patrón de marcado es distinto en las células vegetativa (CV) y generativa (CG). En el núcleo vegetativo las partículas de oro (flechas) aparecen aisladas en el nucleoplasma (**Fig. 93**), mientras que en el generativo, junto a este marcado disperso también se observan agrupaciones de partículas de oro (flechas) en fibras de cromatina descondensada de la región intercromatínica (RI) situadas en la periferia de las masas de cromatina condensada (CR) (**Fig. 94**). La célula generativa comienza a desplazarse hacia el interior del grano de polen, separándose de la pared (**Fig. 95**). En figs. 93 y 94, barra = 0.5  $\mu$ m. En fig. 95, barra = 1  $\mu$ m.



93



94



95

**LÁMINA 31**

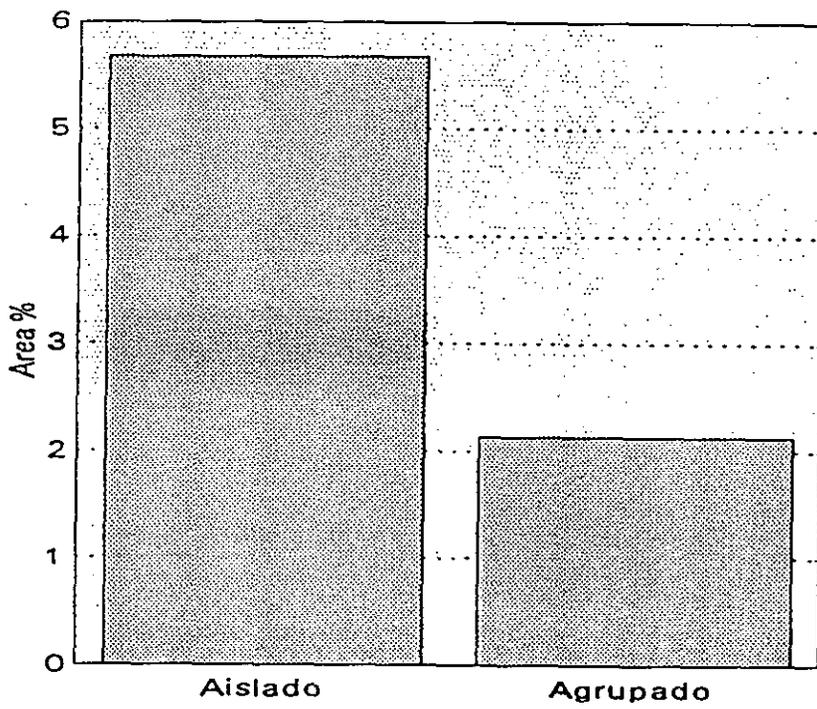
Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-PCNA en la microspora vacuolada

Figura 96

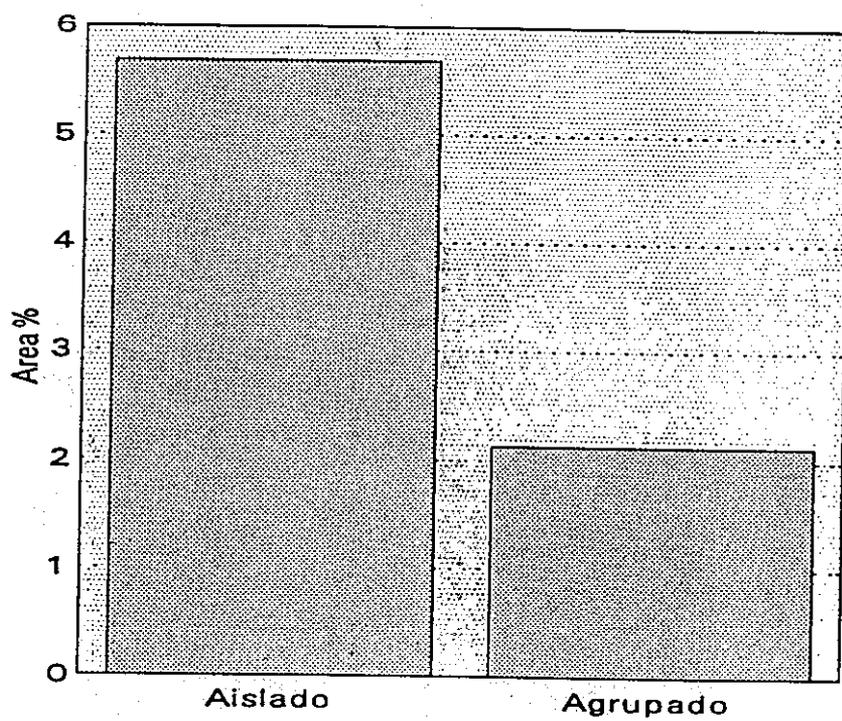
LÁMINA 31. Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-PCNA en la microspora vacuolada

**Figura 96:** Representación gráfica de la distribución del marcado obtenido con anticuerpos anti-PCNA en la fase de microspora vacuolada. En ordenadas se indica el porcentaje del área de la región intercromatínica marcada y en abcisas el tipo de marcado: aislado (1 o 2 partículas de oro) o agrupado (3 o más partículas de oro). En la microspora vacuolada la mayor parte del marcado se encuentra en forma aislada, si bien existe un marcado agrupado importante.

anti-PCNA  
Microspora vacuolada



anti-PCNA  
Microspora vacuolada



**LÁMINA 32**

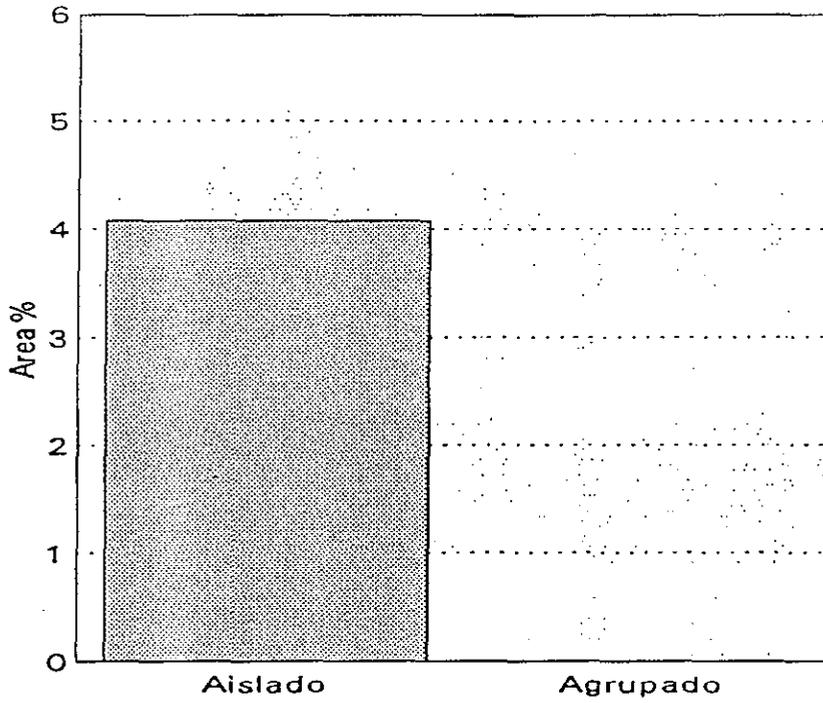
Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-PCNA en el polen bicelular joven

**Figuras 97 y 98**

LÁMINA 32. Análisis estadístico del inmunomarcado con anti-PCNA en el polen bicelular joven

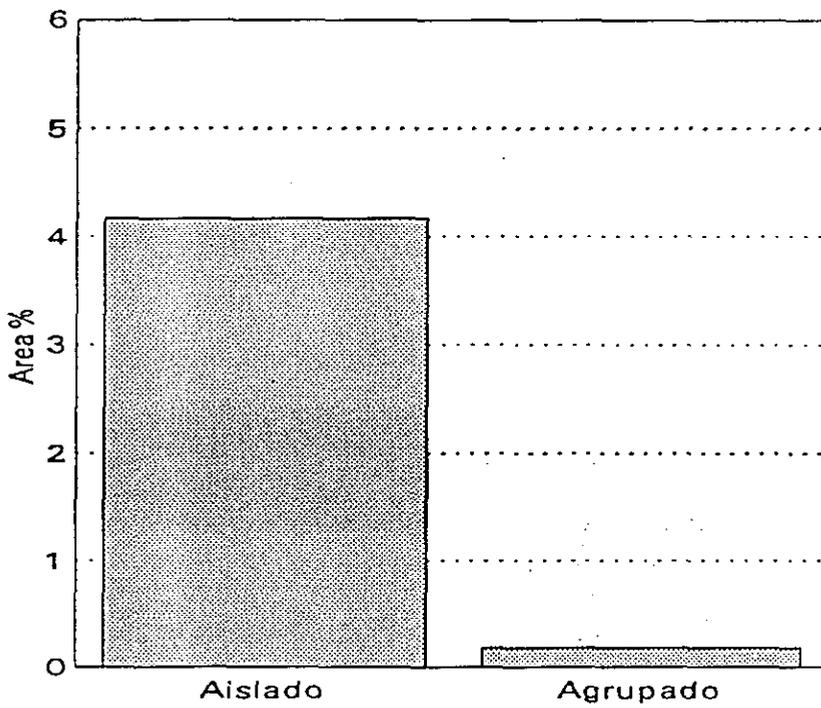
**Figuras 97 y 98:** Representación gráfica de la distribución del marcado obtenido con anticuerpos anti-PCNA en el polen bicelular joven, recién formado: célula vegetativa (Fig. 97) y célula generativa (Fig. 98). En ordenadas se indica el porcentaje del área de la región intercromatínica marcada y en abscisas el tipo de marcado: aislado (1 o 2 partículas de oro) o agrupado (3 o más partículas de oro). La distribución del marcado es similar en las células vegetativa y generativa. Las partículas de oro se encuentran en forma aislada. El marcado agrupado es inexistente o muy bajo.

anti-PCNA  
Celula vegetativa



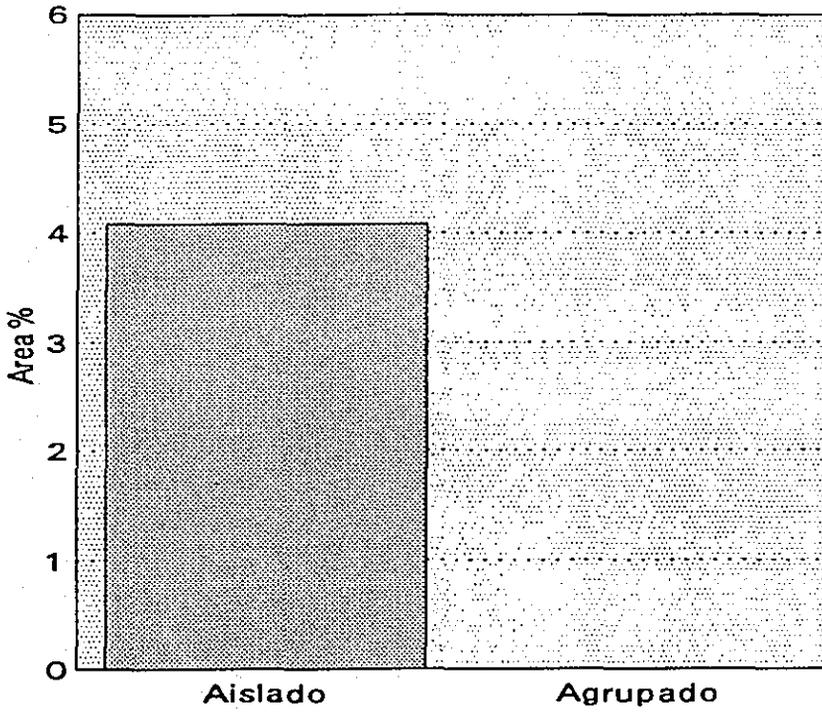
97

anti-PCNA  
Celula generativa



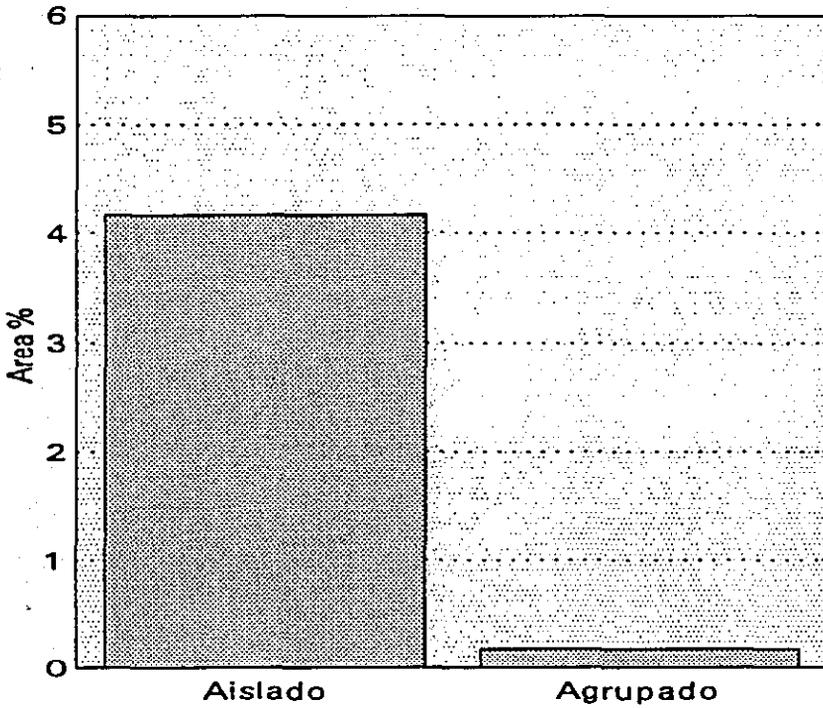
98

anti-PCNA  
Celula vegetativa



97

anti-PCNA  
Celula generativa



98

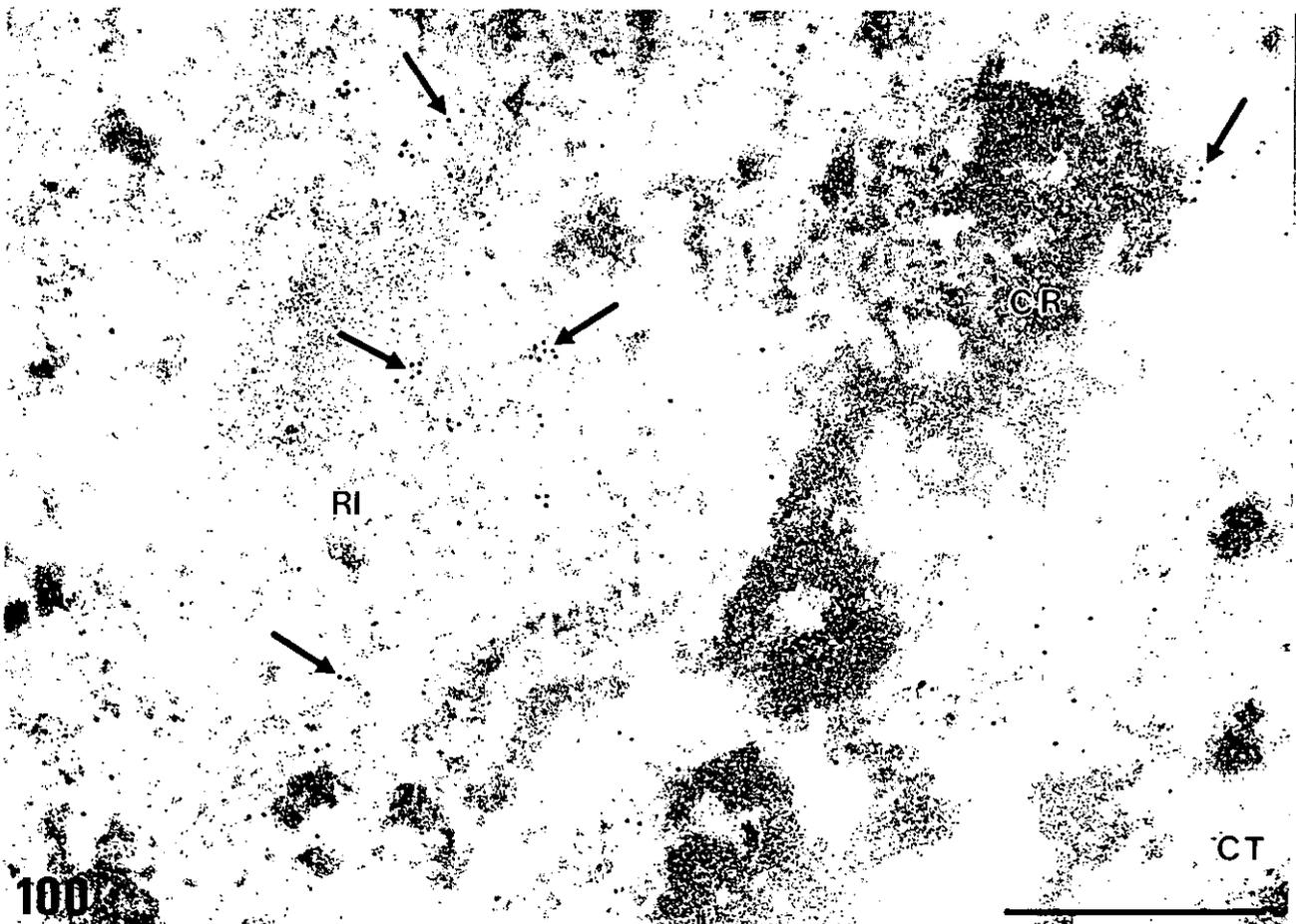
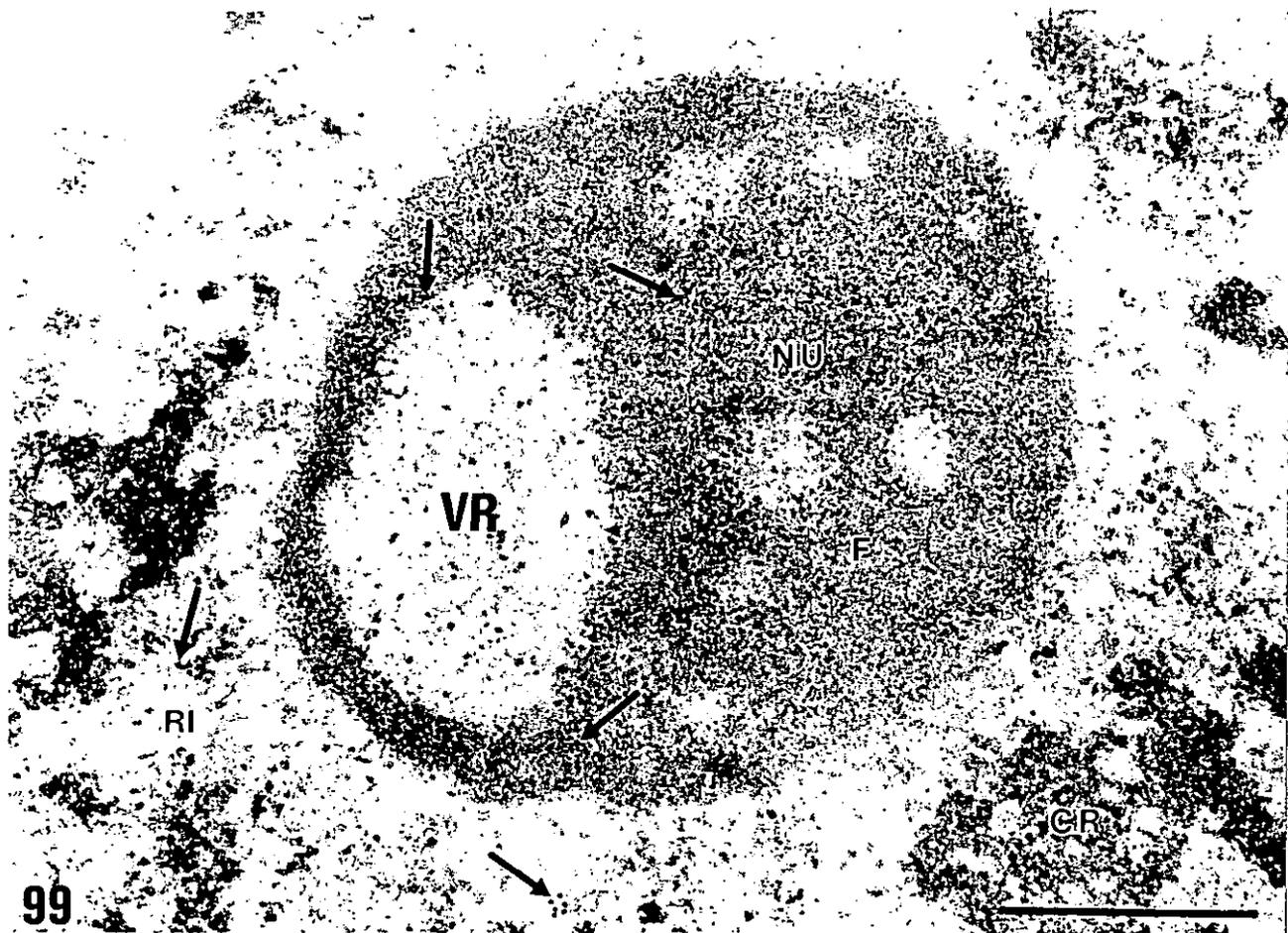
**LÁMINA 33**

Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA.  
Fase de tetrada.

Figuras 99 y 100

LÁMINA 33. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA. Fase de tetrada.

**Figuras 99 y 100:** Regiones nucleares de microsporas jóvenes de *Capsicum annuum* L. en la fase de tetrada. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. En esta fase en la que se observan dos patrones de cromatina, resultado del proceso de descondensación que se inicia en G1 se distinguen dos tipos de marcado. En regiones interiores del núcleo, donde la cromatina está dispersa, se observan abundantes fibras marcadas (flechas). En zonas periféricas se destacan grandes masas de cromatina condensada (CR); el marcado es menos abundante y se localiza en algunas fibras que salen de la cromatina condensada hacia la región intercromatínica (RI). En el nucleolo (NU) (Fig. 99), que se encuentra en fase de reactivación, el marcado es escaso y se localiza en el componente fibrilar denso (F). Las masas de cromatina condensada y citoplasma (CT) están libres de partículas de oro. VR: Vacuola de reactivación. Barra = 0.5  $\mu$ m.



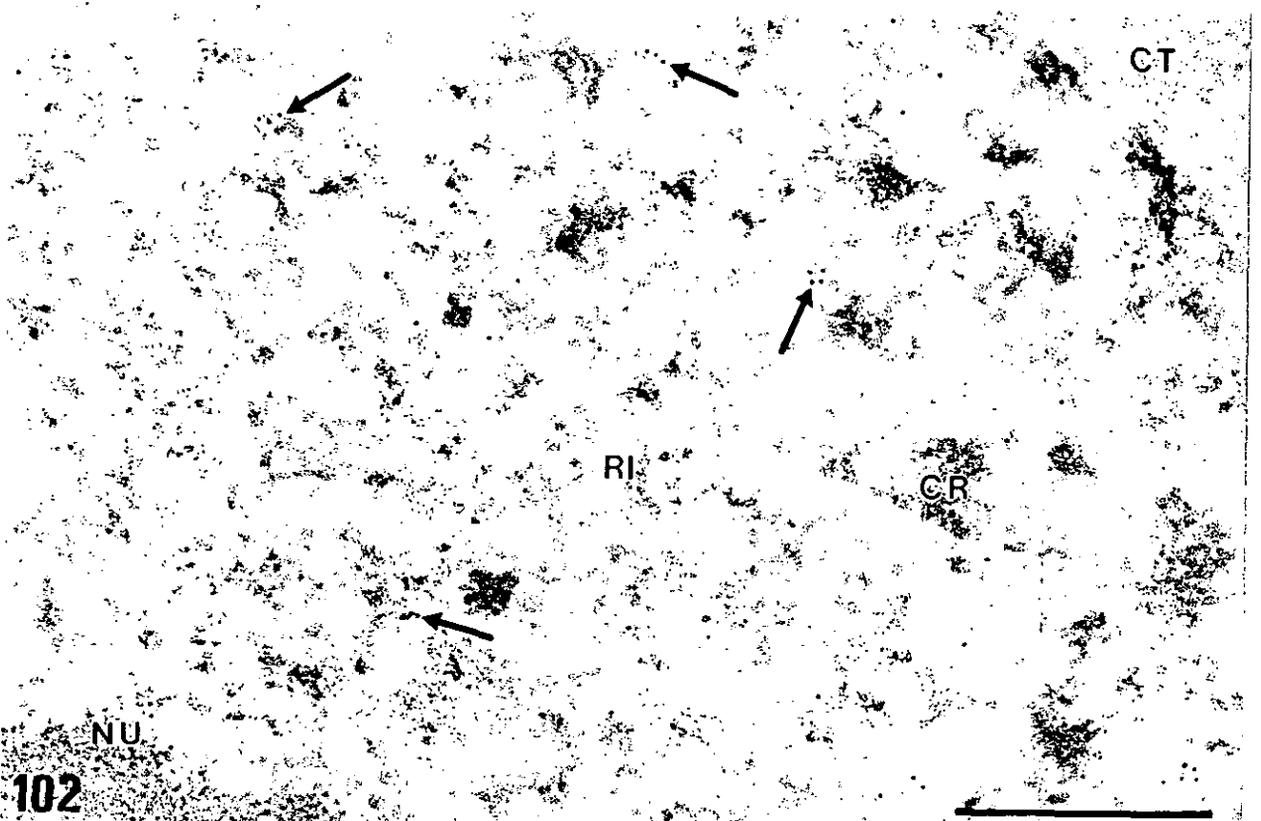
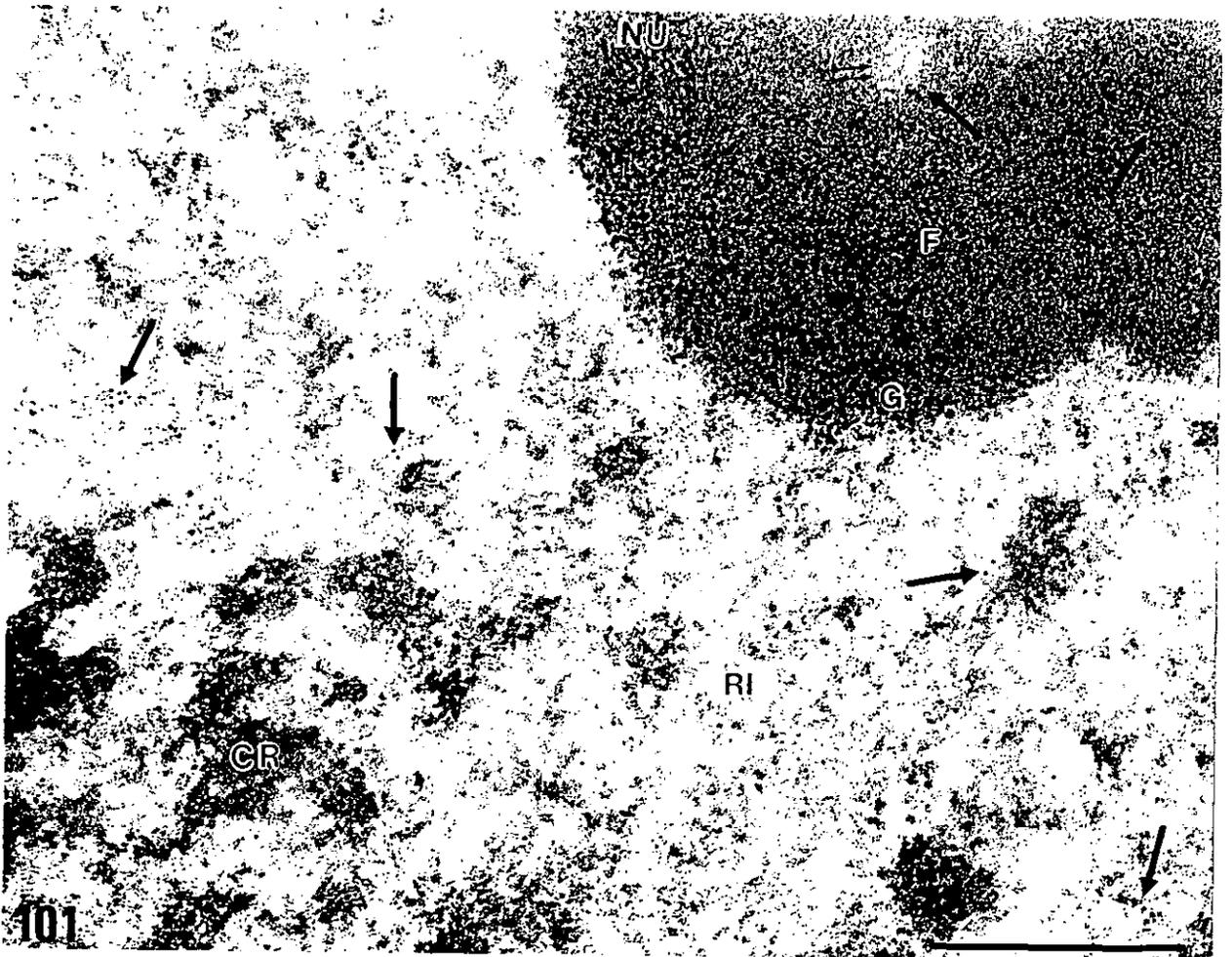
**LÁMINA 34**

Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA.  
Microspora vacuolada

Figuras 101 y 102

LÁMINA 34. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

**Figuras 101 y 102:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro que revelan híbridos DNA/RNA (flechas) se localizan en fibras de la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR), que en este estadio son más pequeñas que en las microsporas jóvenes en la fase de tetrada (Lámina 33). En el nucleolo (NU) (Fig. 101), que comienza a activarse, el marcado no es abundante y se localiza en el componente fibrilar denso (F). Las masas de cromatina condensada, citoplasma (CT) y componente granular (G) están libres de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 35**

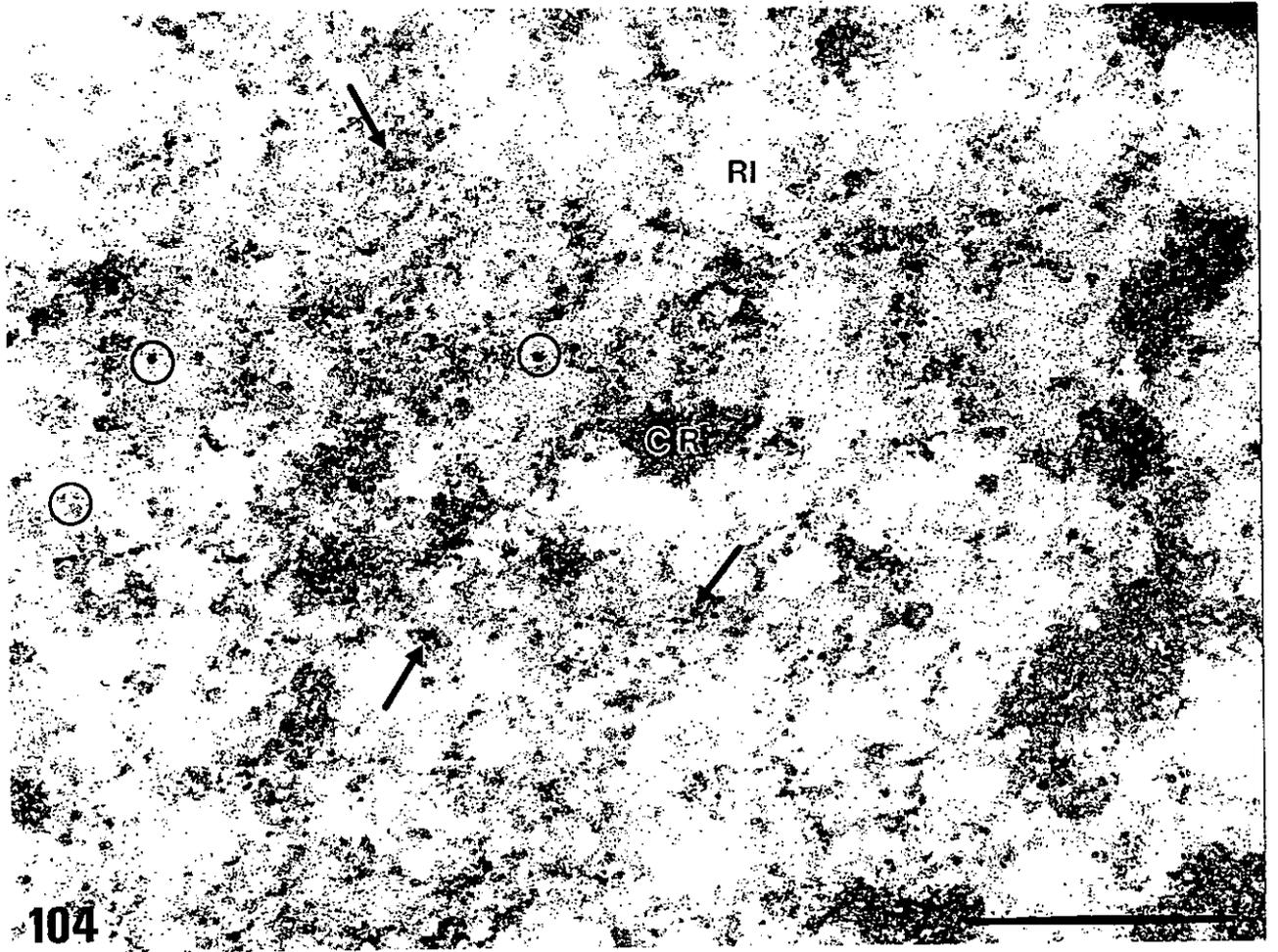
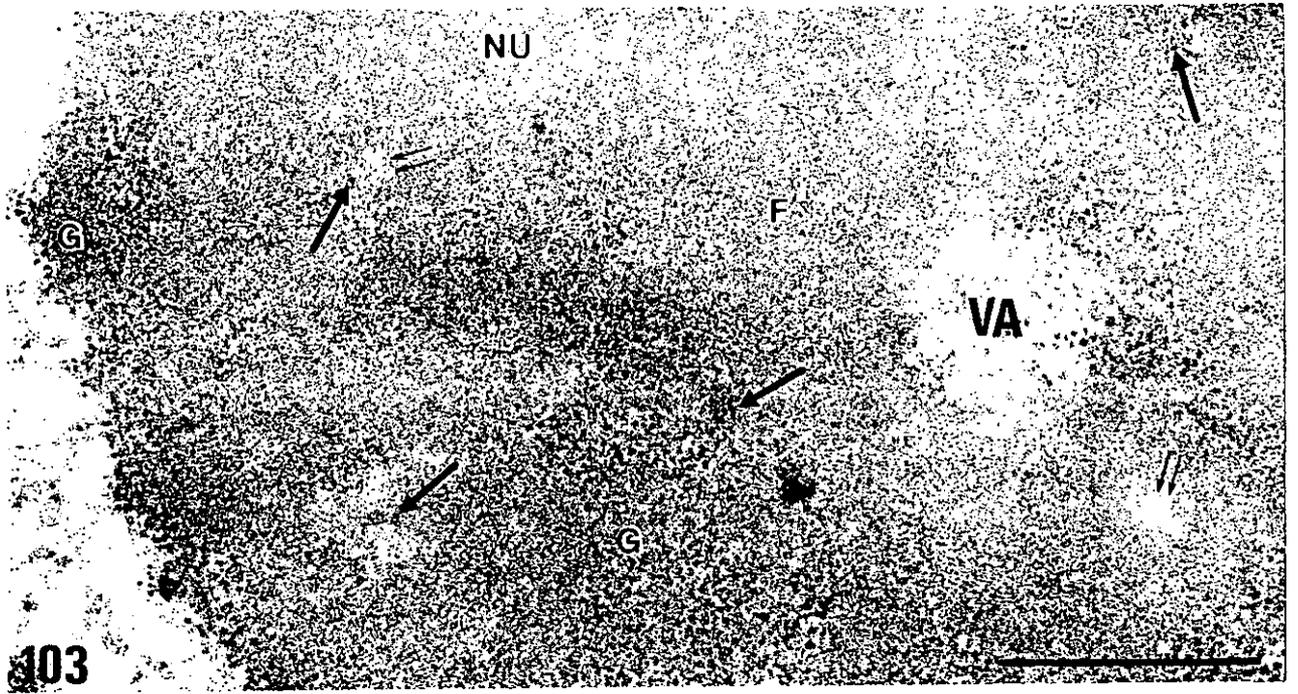
Immunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA.  
Microspora vacuolada

Figuras 103 y 104

---

LÁMINA 35. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

**Figuras 103 y 104:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro que revelan híbridos DNA/RNA (flechas) se localizan en la región intercromatínica (RI) y periferia de las masas de cromatina condensada (CR). La región intercromatínica es rica en estructuras granulares (círculos) y fibrilares; en estas últimas es donde se localiza el marcado. El nucleolo (NU) (Fig. 103) es activo y el marcado es abundante en ciertas regiones del componente fibrilar denso (F), ocasionalmente, en la periferia de los centros fibrilares homogéneos (doble flecha). Las masas de cromatina condensada y el componente granular (G) están libres de partículas de oro. VA: Vacuola de actividad. Barra = 0.5  $\mu$ m.



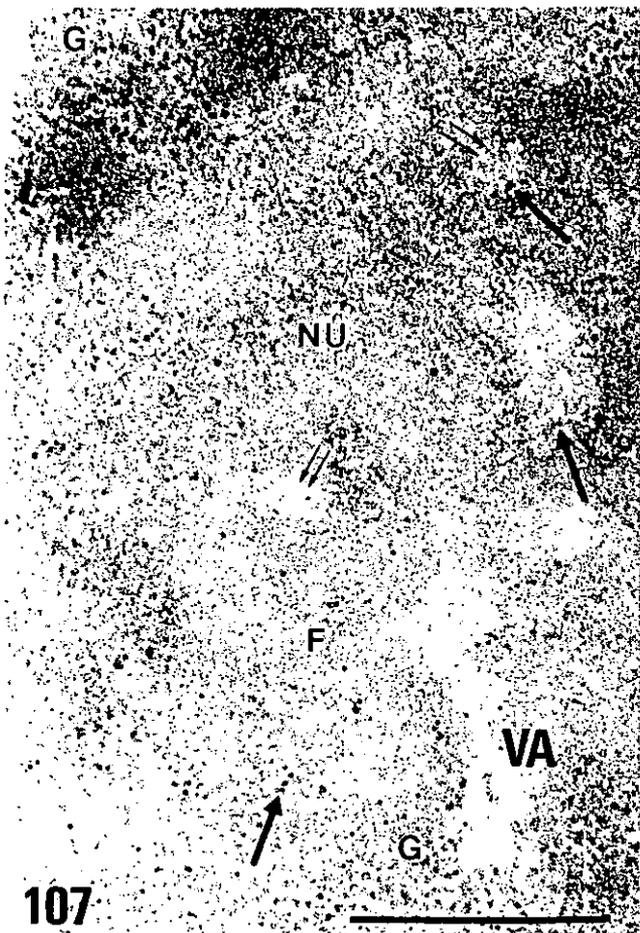
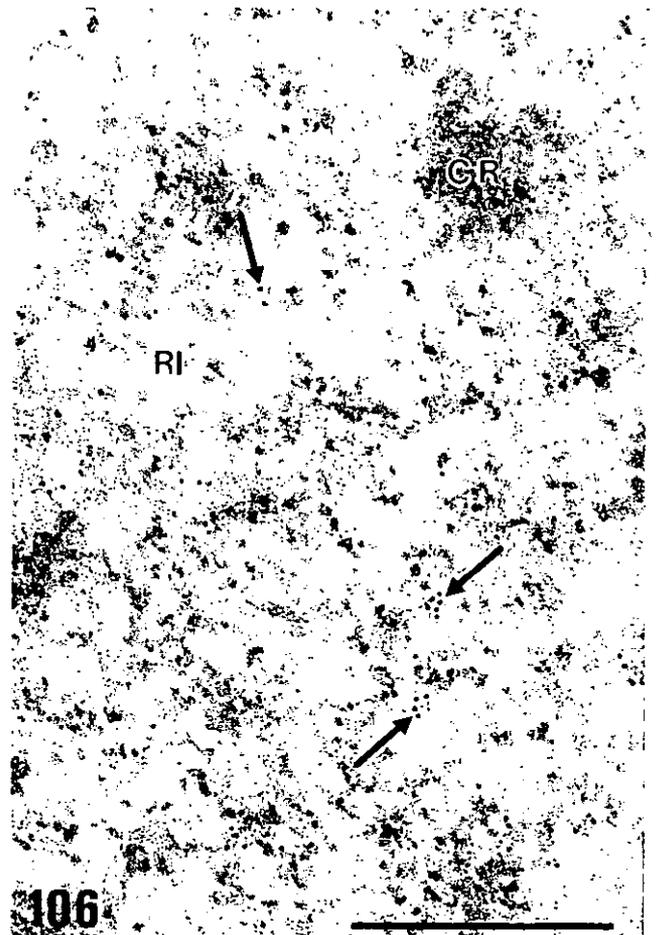
**LÁMINA 36**

Inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA.  
Polen bicelular joven

Figuras 105 - 108

LÁMINA 36. Inmunofocalización de híbridos DNA/RNA en combinación con la citoquímica MA. Polen bicelular joven

**Figuras 105-108:** Regiones nucleares de células generativa (Figs. 105 y 106) y vegetativa (Figs. 107 y 108) de polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L. Inmunofocalización de híbridos DNA/RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El nucleolo generativo (NU) (Fig. 105) es poco activo y en él el marcado (flechas) aparece en el componente fibrilar denso (F) y la periferia de los centros fibrilares homogéneos (doble flecha). En el mismo grano de polen, el nucleolo vegetativo (Fig. 107) muestra un estado de actividad más avanzado, con el componente granular (G) entremezclado con el fibrilar denso y presencia de vacuolas de actividad (VA). El patrón de marcado es semejante al descrito en el nucleolo generativo, si bien es más intenso. En la región intercromatínica (RI) las partículas de oro que revelan híbridos DNA/RNA (flechas) se localizan sobre estructuras fibrilares (Figs. 106 y 108). Las masas de cromatina condensada (CR), citoplasma (CT) y componente granular están libres de partículas de oro. Flecha curva: entrada del organizador nucleolar en el nucleolo generativo. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 37**

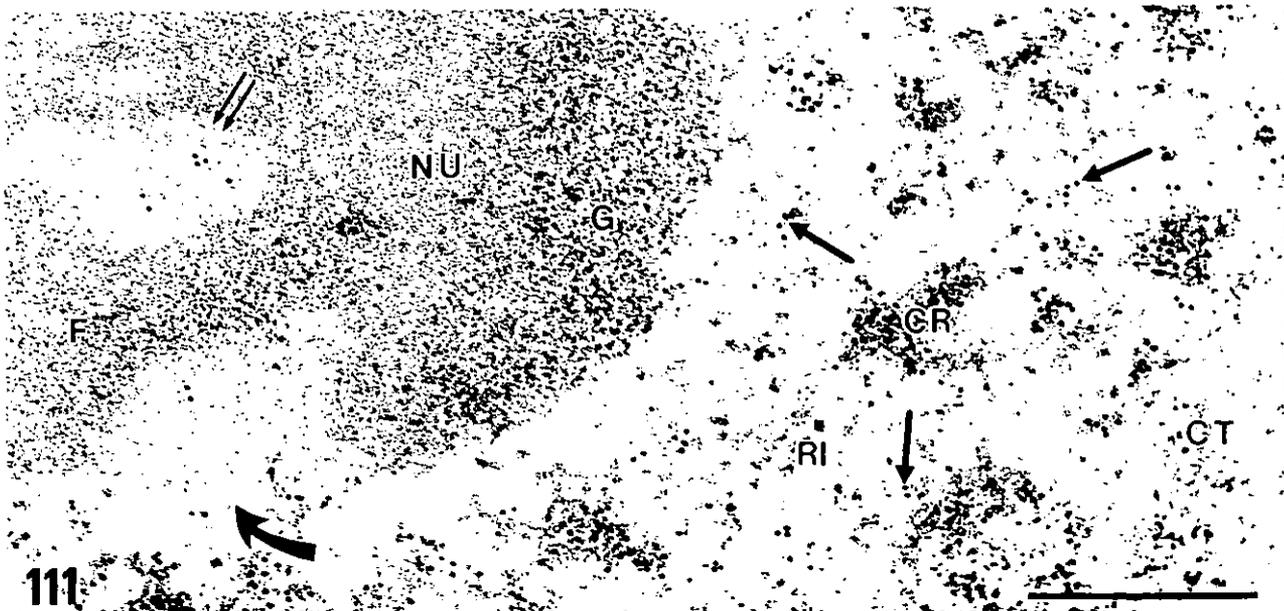
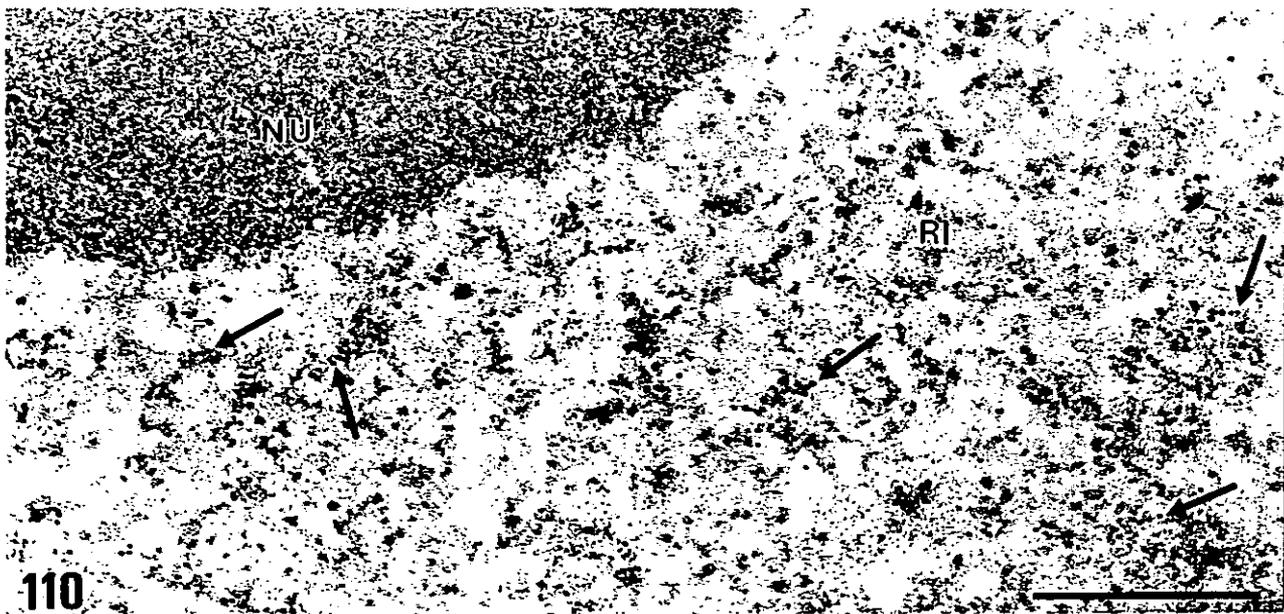
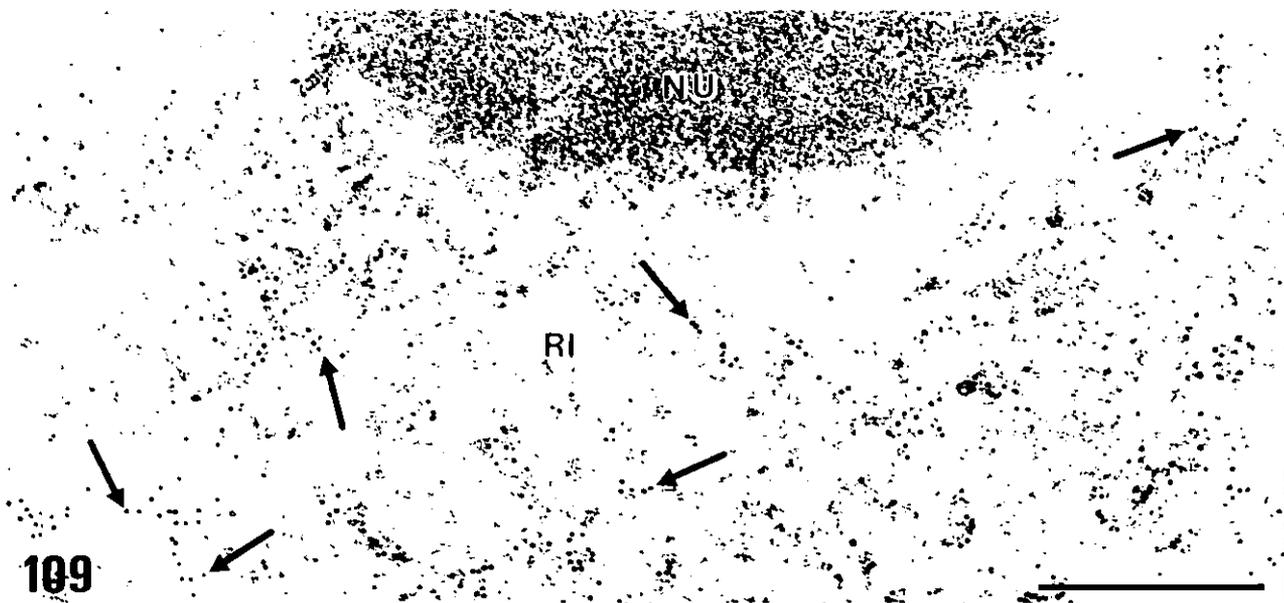
Reacción de TdT *in situ* para localizar DNA, en combinación con la citoquímica MA.  
Fases de microspora vacuolada y polen bicelular joven

Figuras 109 - 111

---

LÁMINA 37. Reacción de TdT *in situ* para localizar DNA, en combinación con la citoquímica MA. Fases de microspora vacuolada y polen bicelular joven

**Figuras 109-111:** Regiones nucleares de microspora vacuolada (Fig. 109) y células vegetativa (Fig. 110) y generativa (Fig. 111) de polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L. Reacción de TdT realizada *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro que localizan DNA se distribuyen sobre las masas de cromatina condensada (CR) y algunas fibras (flechas) de la región intercromatinica (RI) (Figs. 109-111). En el nucleolo (NU) el marcado se localiza en el componente fibrilar denso (F), centros fibrilares homogéneos (doble flecha) y entrada del organizador nucleolar (flecha curva), que contiene la cromatina ribosómica, en el núcleo generativo (Fig. 111). Se observa un diferente patrón de condensación de la cromatina en diferentes estadios de desarrollo y tipos celulares. En determinados estadios de la fase de microspora vacuolada (Figs. 109) y en la célula vegetativa (Figs. 110) la cromatina está dispersa; en cambio en el núcleo de la célula generativa (Fig. 111), se observan abundantes masas de cromatina condensada. El citoplasma (CT) y el componente granular (G) del nucleolo están libres de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu$ m.



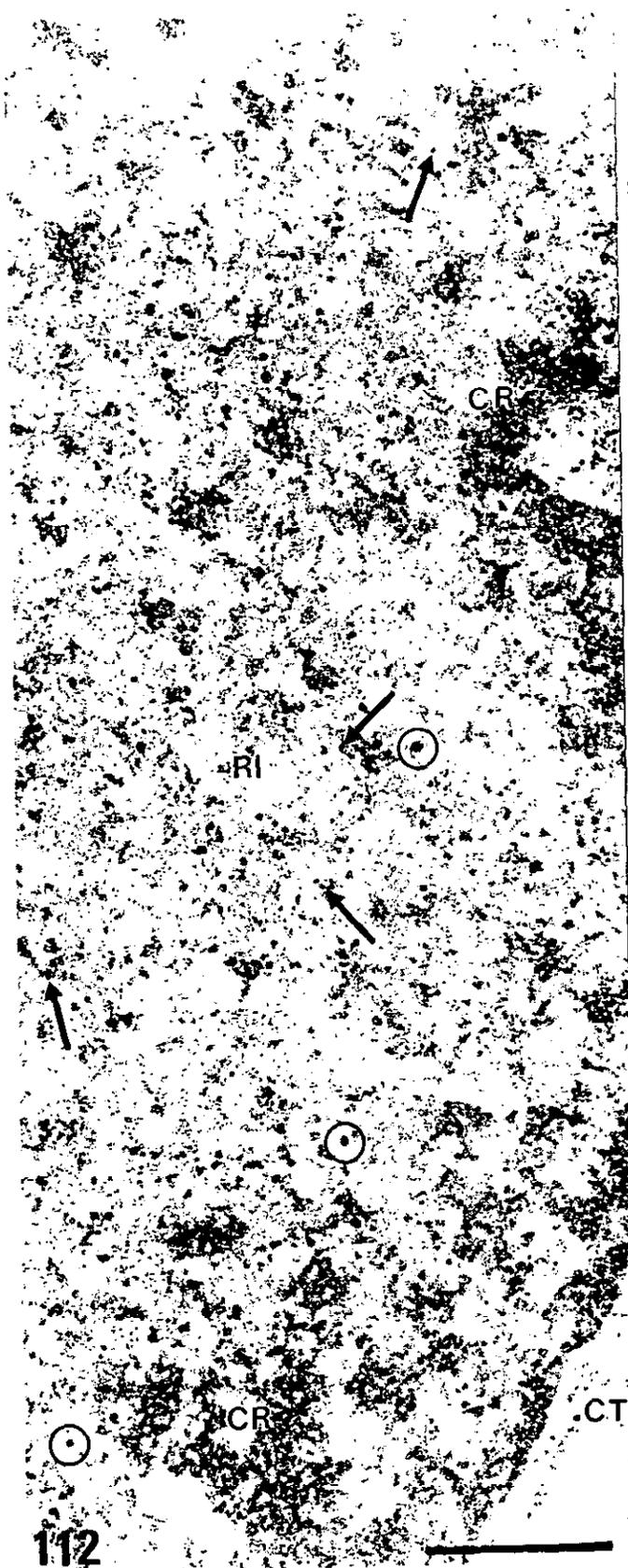
**LÁMINA 38**

Inmunolocalización de snRNPs con el anticuerpo 7.13, en combinación con la  
citoquímica MA. Polen bicelular joven

Figuras 112 y 113

LÁMINA 38. Inmunolocalización de snRNPs con el anticuerpo 7.13, en combinación con la citoquímica MA. Polen bicelular joven

**Figuras 112 y 113:** Regiones nucleares de las células generativa (Fig. 112) y vegetativa (Fig. 113) de polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de snRNPs. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro que localizan los snRNPs se encuentran sobre fibras (flechas) de la región intercromatínica (RI), pero no sobre los gránulos intercromatínicos (círculos). Se observa un diferente patrón de condensación de la cromatina entre los núcleos generativo (Fig. 112) y vegetativo (Fig. 113): las masas de cromatina condensada (CR) son más abundantes en la célula generativa que en la vegetativa. El citoplasma (CT) y las masas de cromatina condensada están libres de marcado. Barra = 0.5  $\mu$ m.



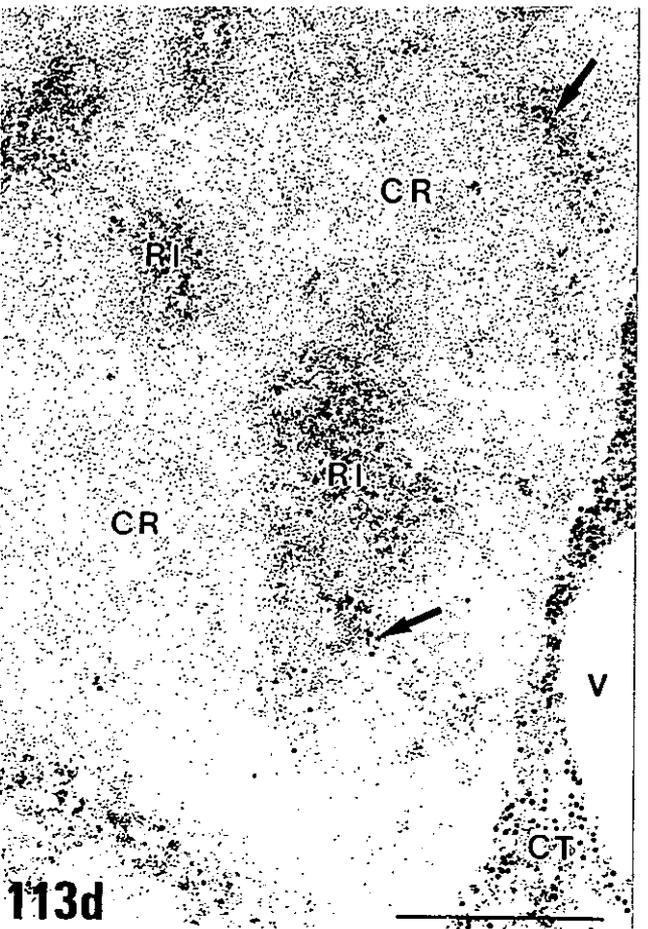
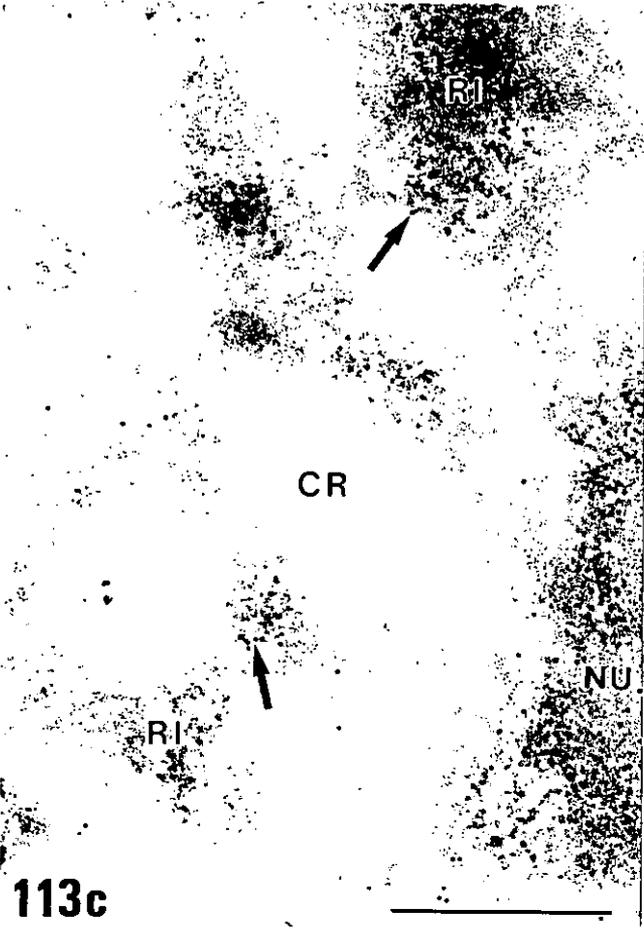
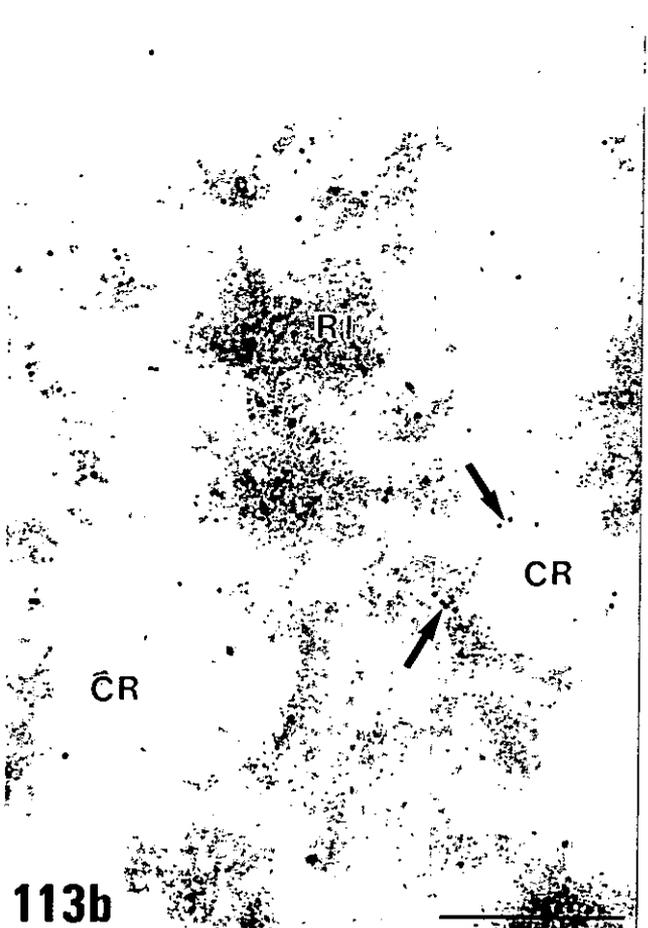
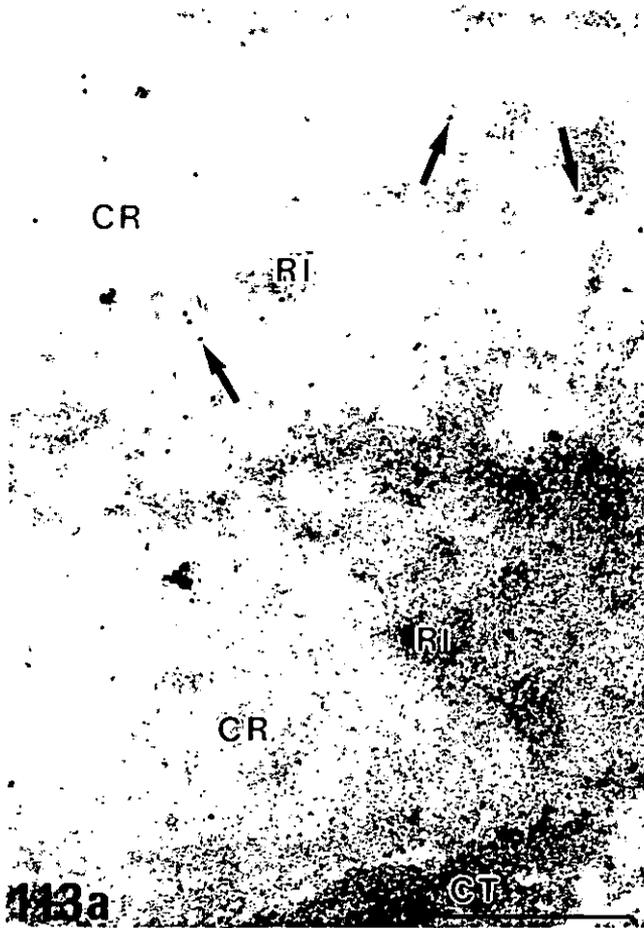
**LÁMINA 39**

Immunolocalización de snRNPs y RNA en combinación con citoquímicas que  
contrastan preferencialmente la región intercromatínica

Figuras 113a - 113d

LÁMINA 39: Inmunolocalización de snRNPs y RNA en combinación con citoquímicas que contrastan preferencialmente la región intercromatínica

**Figuras 113a - 113d:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de snRNPs con el anticuerpo 7.13 y tinción de los cortes con EDTA (Figs. 113a y 113b). El marcado se localiza sobre estructuras de la región intercromatínica (RI) preferencialmente teñidas por EDTA. Las flechas señalan partículas de oro situadas en el borde entre la región intercromatínica y áreas blanqueadas en las que se localiza la cromatina (CR), que no presentan marcado significativo. Inmunolocalización de RNA mediante el empleo de anticuerpos anti-RNA sobre cortes ultrafinos teñidos con EDTA (Fig. 113c) o procedentes de muestras tratadas con MA y posterior digestión con DNasa (Fig. 113d). Ambos métodos citoquímicos contrastan preferencialmente las estructuras ricas en RNA: región intercromatínica, nucleolo (NU) y citoplasma (CT). En la región intercromatínica el marcado anti-RNA sigue el mismo patrón que la distribución de las partículas de oro que revelan snRNPs, aunque su intensidad es menor. Las flechas destacan la presencia de partículas de oro sobre estructuras situadas en el borde entre la región intercromatínica y áreas no contrastadas ocupadas por la cromatina (CR), que no presenta marcado. Las áreas ricas en ribosomas del citoplasma también se marcan con anticuerpos anti-RNA, mientras que las vacuolas citoplásmicas (V) están libres de partículas de oro. Barra = 0.5  $\mu$ m.



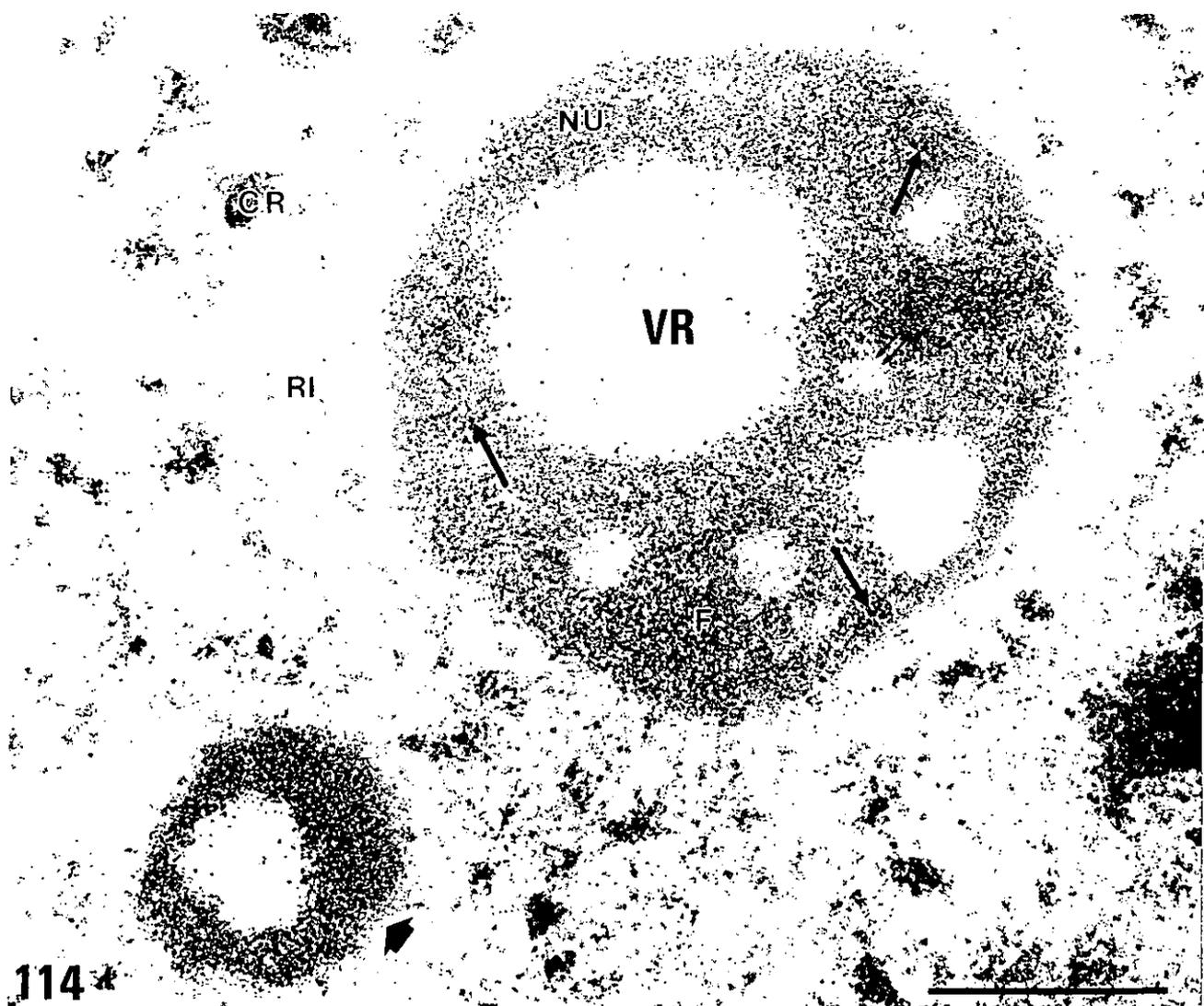
**LÁMINA 40**

Immunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Fase de tetrada.

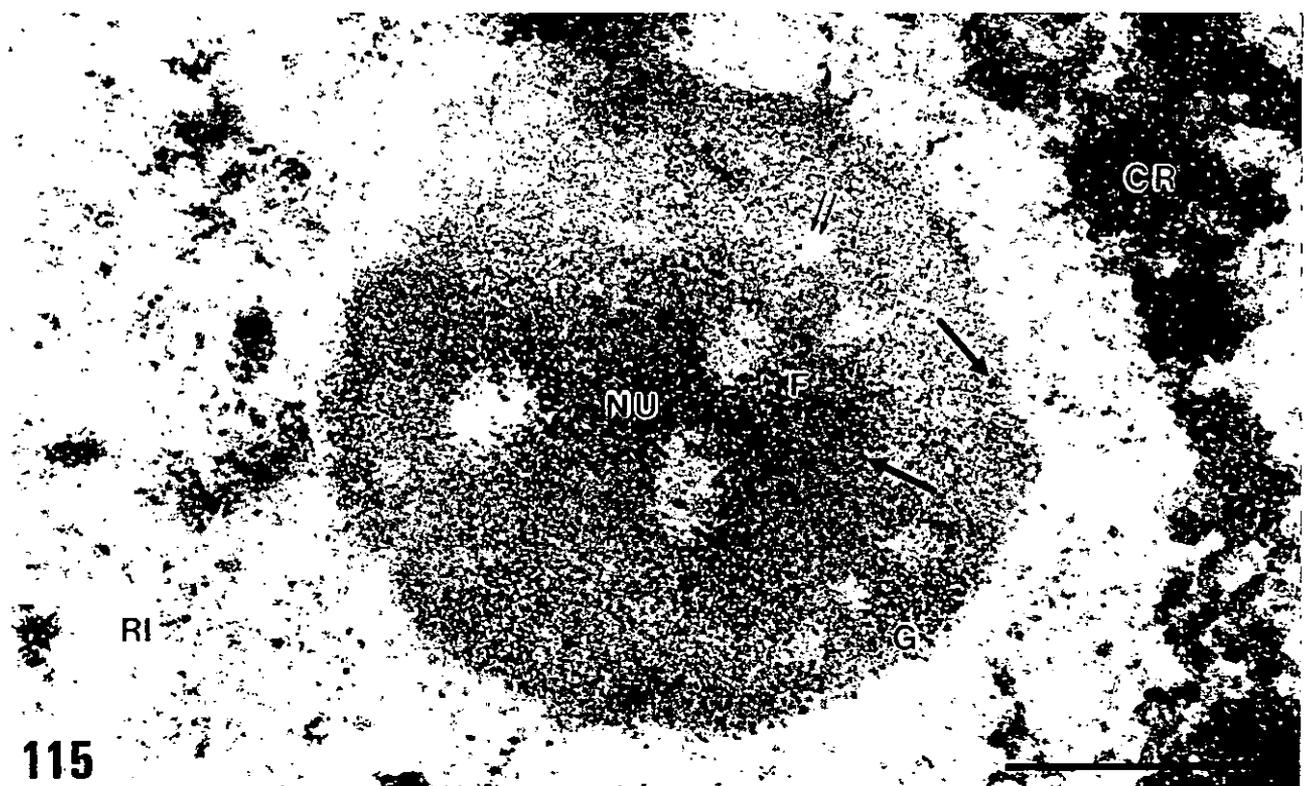
Figuras 114 y 115

LÁMINA 40. Inmunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Fase de tetrada.

**Figuras 114 y 115:** Regiones nucleares de microsporas jóvenes de *Capsicum annuum* L. en la fase de tetrada. Inmunolocalización del factor UBF. Citoquímica MA realizada en bloque. El componente fibrilar denso (F) del nucleolo (NU) está específicamente marcado (flechas) aunque no muy abundantemente, como corresponde a esta fase del desarrollo del polen en la que el nucleolo se encuentra en reactivación. Sus principales componentes son vacuolas de reactivación (VR), algunos centros fibrilares homogéneos (doble flecha), componente fibrilar denso y una fina capa de componente granular (G) en la periferia. Se observa un cuerpo nuclear (flecha) específicamente marcado. No hay partículas de oro ni en la región intercromatínica (RI) ni en las masas de cromatina condensada (CR). Barra = 0.5  $\mu$ m.



114



115

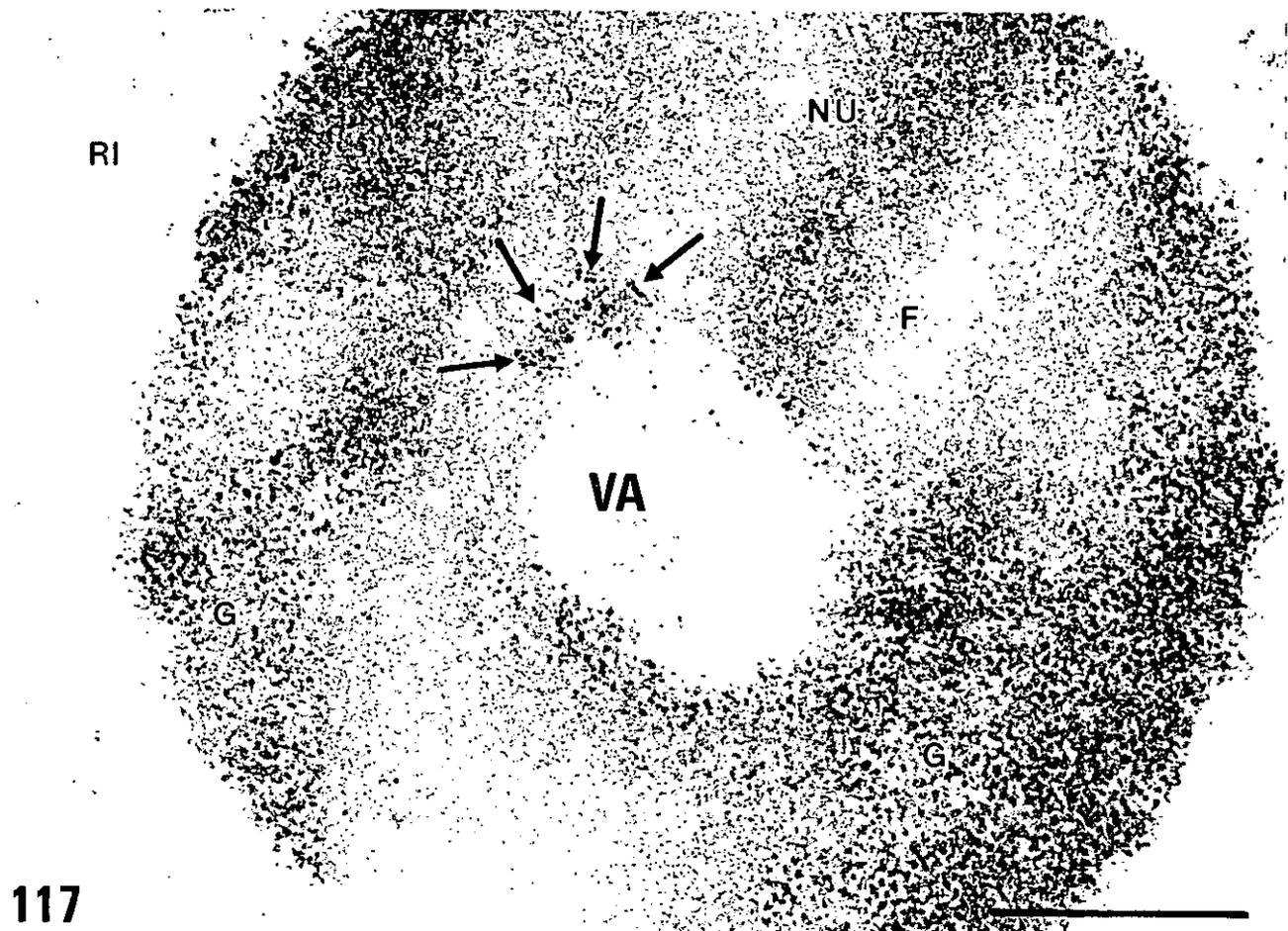
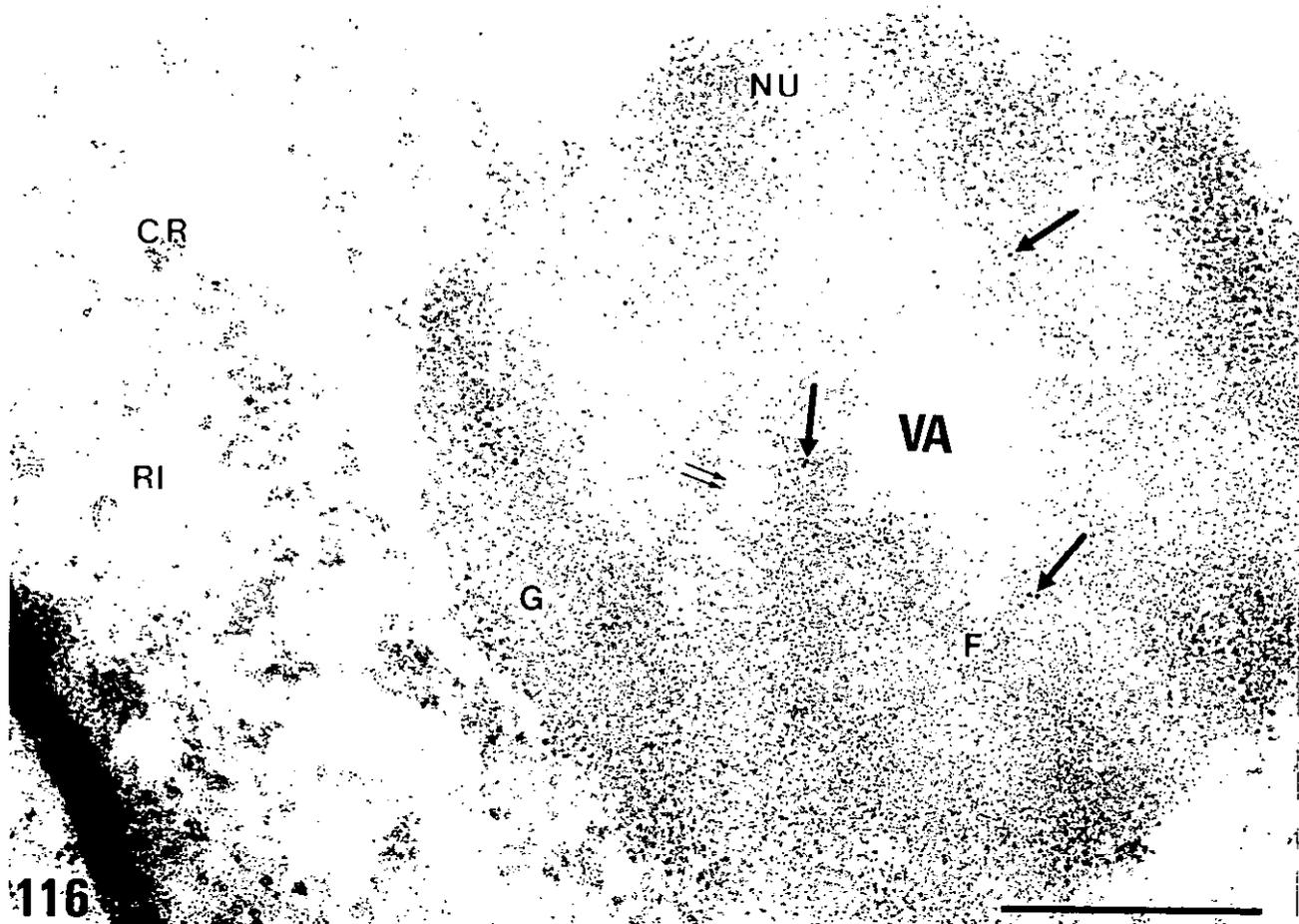
**LÁMINA 41**

Immunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

Figuras 116 y 117

LÁMINA 41. Inmunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

**Figuras 116 y 117:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización del factor UBF. Citoquímica MA realizada en bloque. El componente fibrilar denso (F) del nucleolo (NU) está específicamente marcado. A medida que el nucleolo se activa, el marcado (flechas) es más abundante. En estadios muy activos (**Fig. 117**) el marcado es intenso. Se observa como progresa la activación del nucleolo desde la fase representada en la fig. 116 a la que se muestra en la fig. 117. El componente granular (G) se hace más abundante y no solo ocupa una posición periférica sino que se entremezcla con el componente fibrilar denso y establece contacto con las vacuolas de actividad (VA) en cuyo interior se distinguen partículas prerribosómicas. No hay partículas de oro ni en la región intercromatinica (RI) ni en las masas de cromatina condensada (CR) ni en componentes del nucleolo distintos del fibrilar denso. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 42**

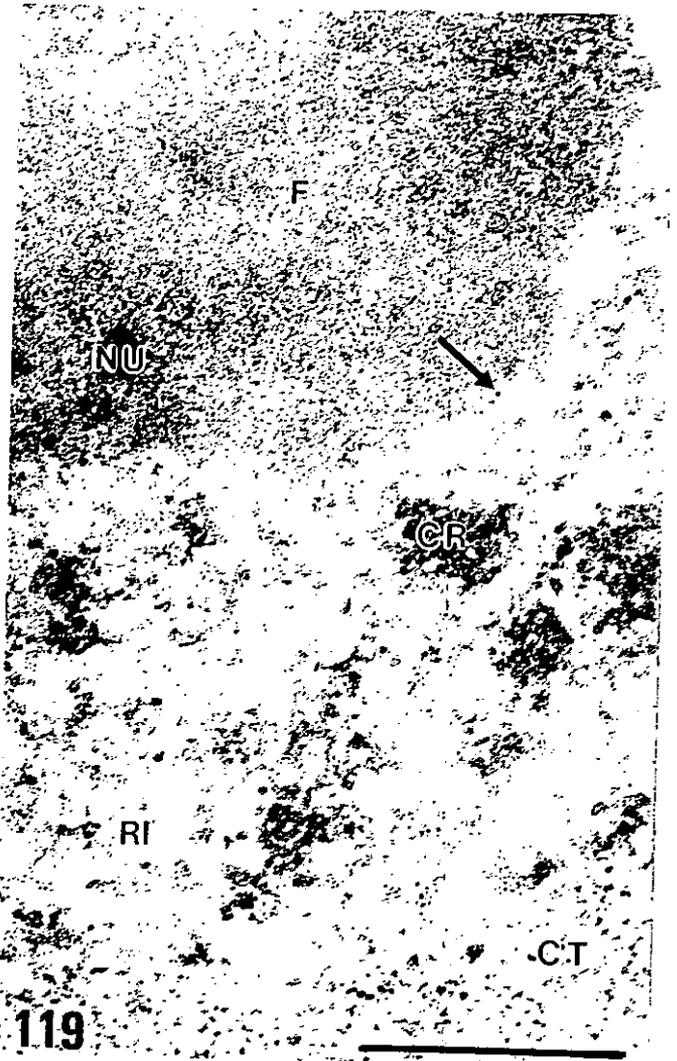
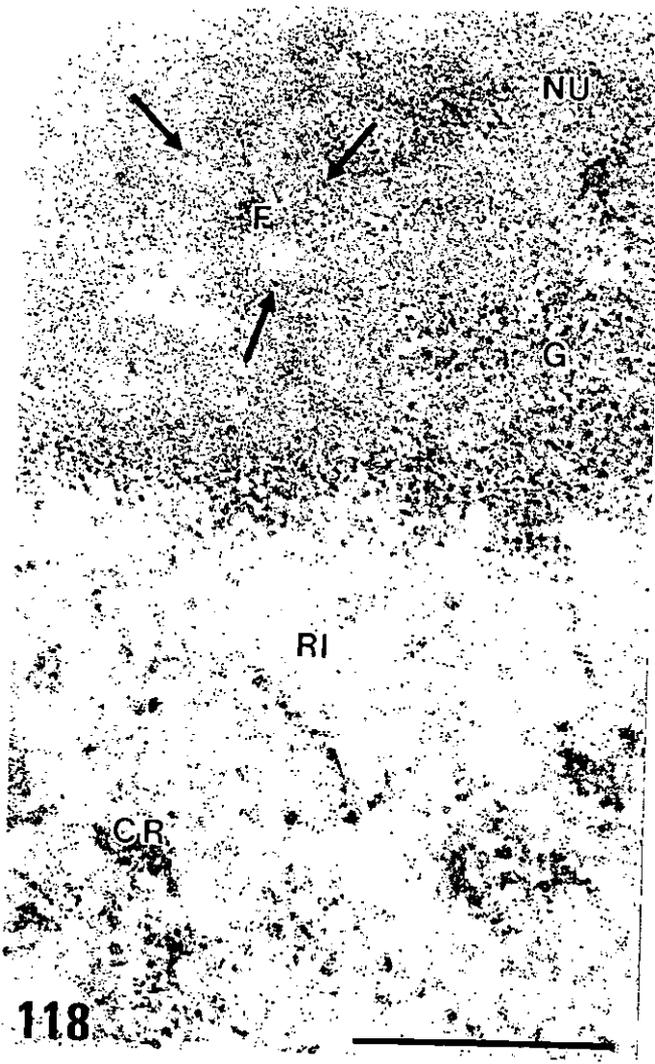
Inmunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Polen bicelular joven

Figuras 118 y 119

---

LÁMINA 42. Inmunolocalización del factor de transcripción nucleolar UBF con el anticuerpo anti-NOR90, en combinación con la citoquímica MA. Polen bicelular joven

**Figuras 118 y 119:** Regiones nucleares de las células vegetativa (Fig. 118) y generativa (Fig. 119) de polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización del factor UBF. Citoquímica MA realizada en bloque. Se observan diferencias en el marcado y estado de actividad del nucleolo (NU) entre las células vegetativa y generativa. Algunas partículas de oro (flechas) se localizan en el componente fibrilar denso (F) del nucleolo vegetativo, mientras que el marcado en el generativo no es significativo. Estos datos coinciden con el estado de actividad que presentan ambos nucleolos. En esta fase muy temprana del desarrollo del polen bicelular, el nucleolo vegetativo es poco activo, mientras que el generativo muestra una morfología característica de nucleolos inactivos, compuestos principalmente por componente fibrilar denso. El patrón de condensación de la cromatina es similar en los núcleos vegetativo y generativo, indicando que se trata de un momento próximo a la formación del grano de polen bicelular. No hay partículas de oro en la región intercromatínica (RI), masas de cromatina condensada (CR), componentes del nucleolo distintos del fibrilar denso y citoplasma (CT). Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



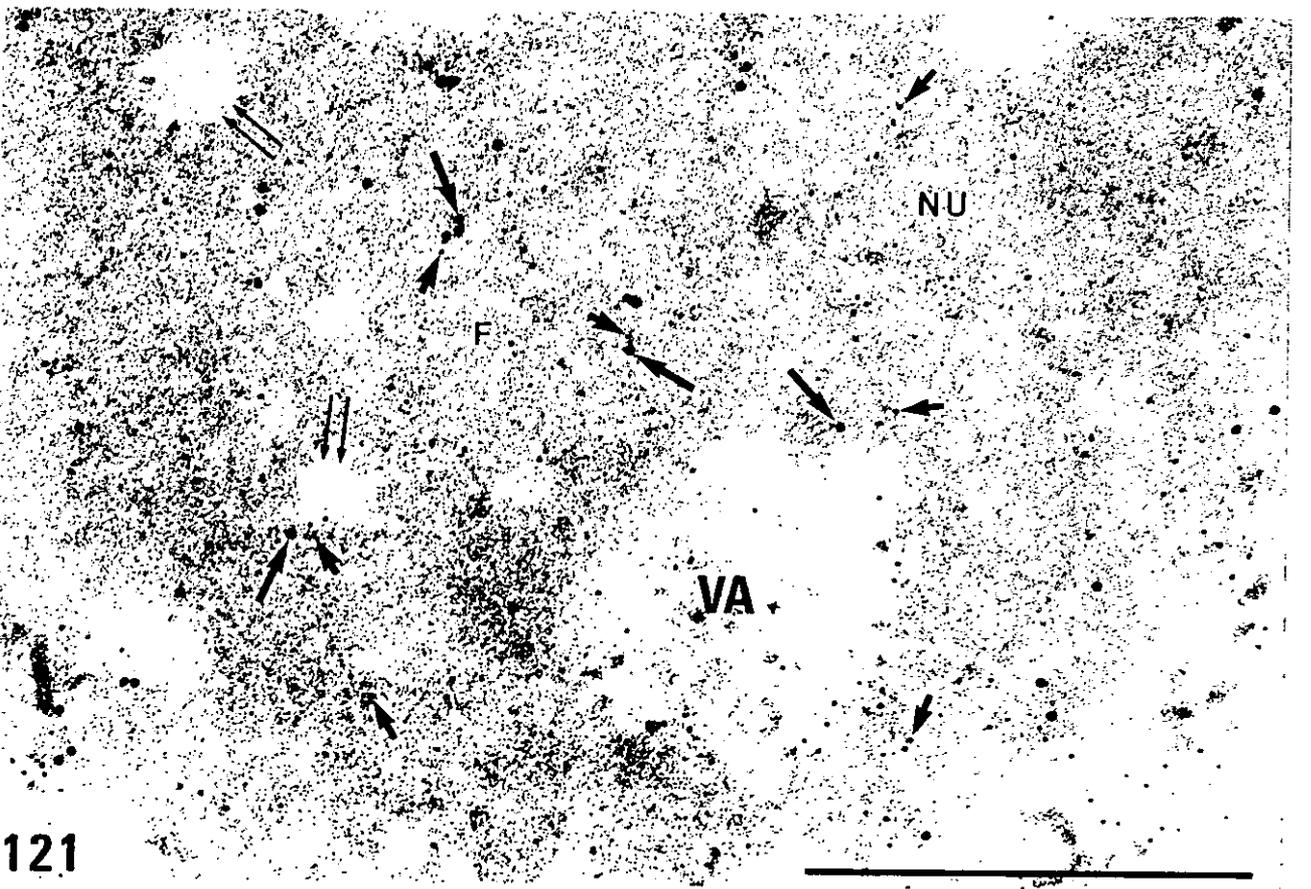
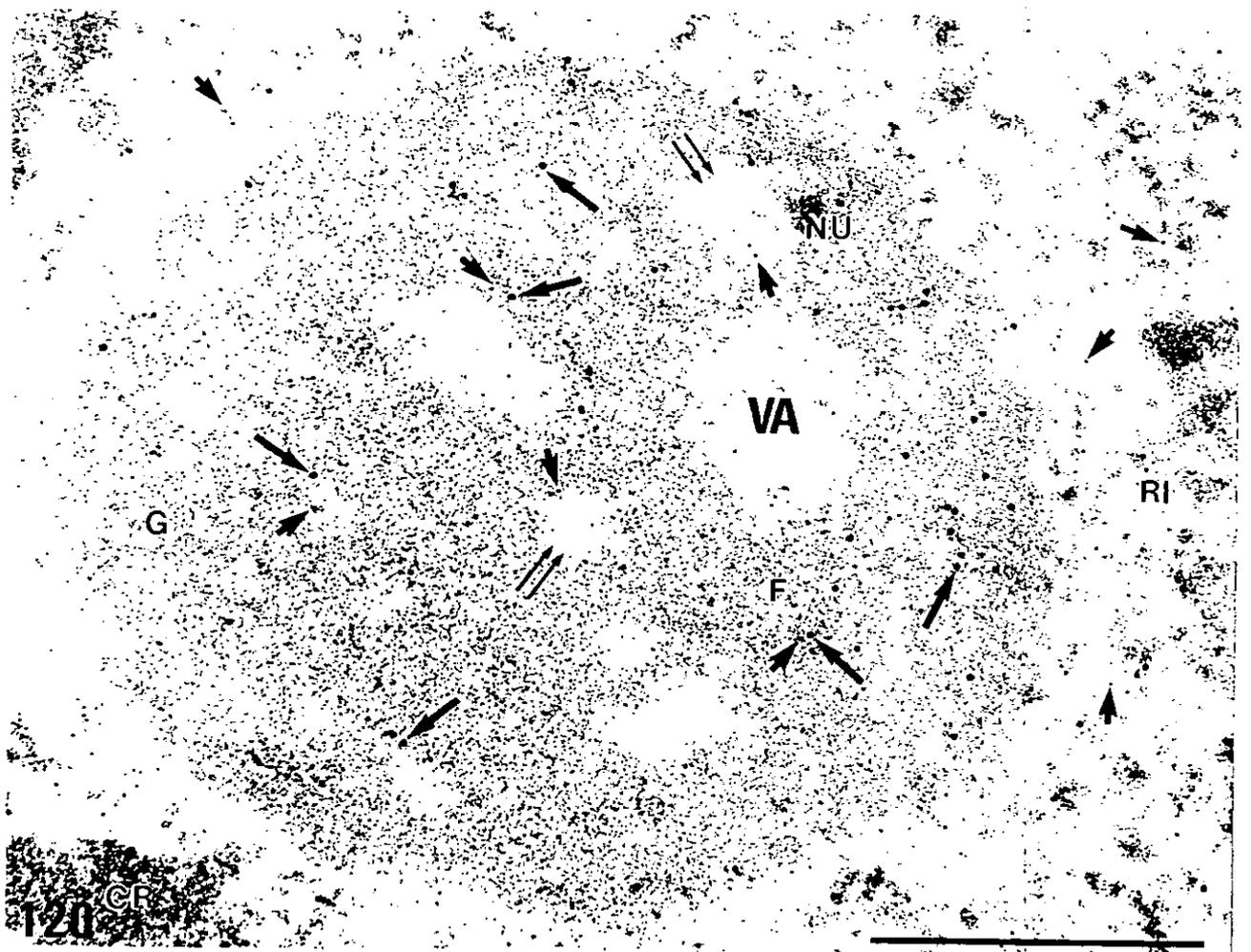
**LÁMINA 43**

Doble inmunolocalización de híbridos DNA/RNA y el factor UBF, en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

Figuras 120 y 121

LÁMINA 43. Doble inmunolocalización de híbridos DNA/RNA y el factor UBF, en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada.

**Figuras 120 y 121:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. que muestran nucleolos activos. Doble inmunolocalización de híbridos DNA/RNA y el factor UBF. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro de 5 nm (flechas cortas) revelan los híbridos DNA/RNA y las de 10 nm (flechas largas) el factor UBF. En el nucleolo (NU) las partículas de oro de los dos tamaños se localizan en el componente fibrilar denso (F), en ocasiones en la proximidad de los centros fibrilares homogéneos (doble flecha). El componente granular (G), vacuolas de actividad (VA) y centros fibrilares homogéneos no están significativamente marcados. Algunas fibras de la región intercromatínica (RI) se marcan con partículas de oro de 5 nm, que localizan híbridos DNA/RNA. Barra = 0.5  $\mu$ m.



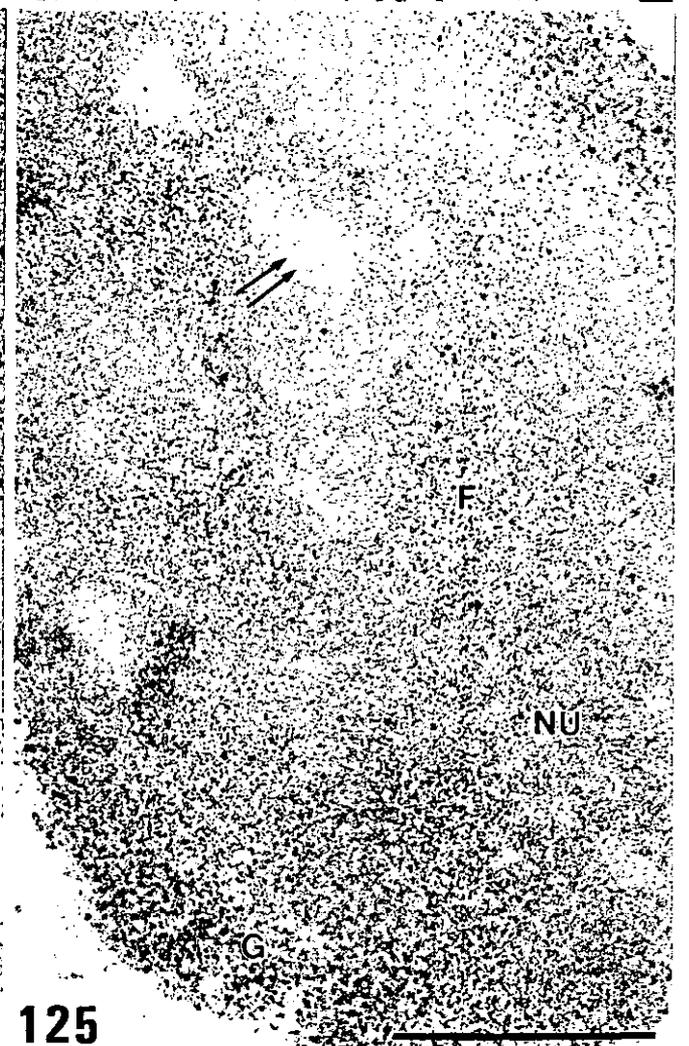
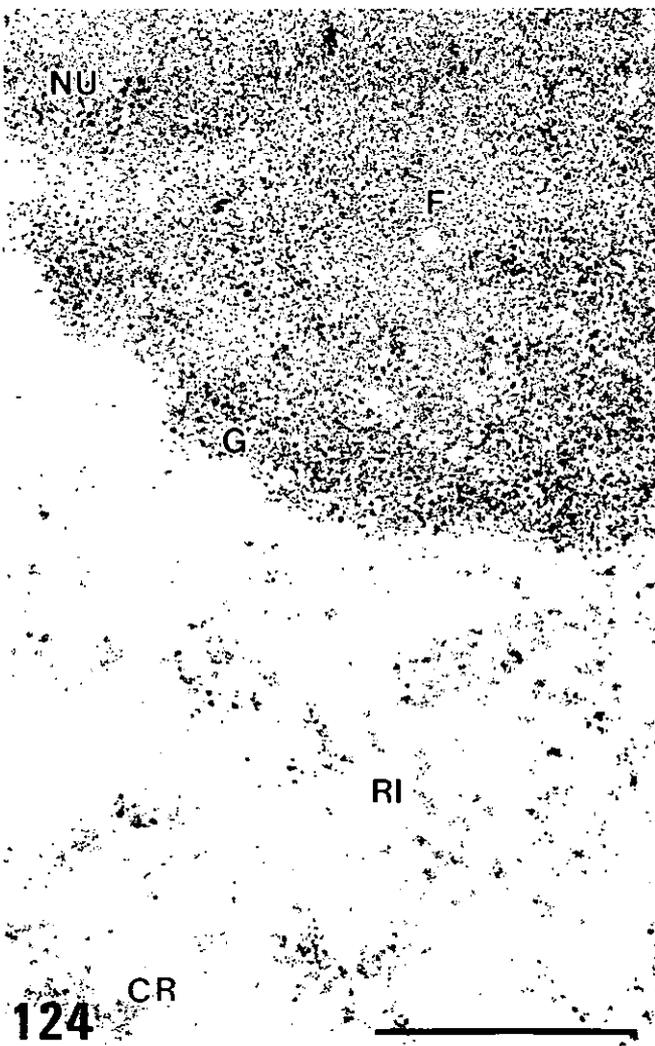
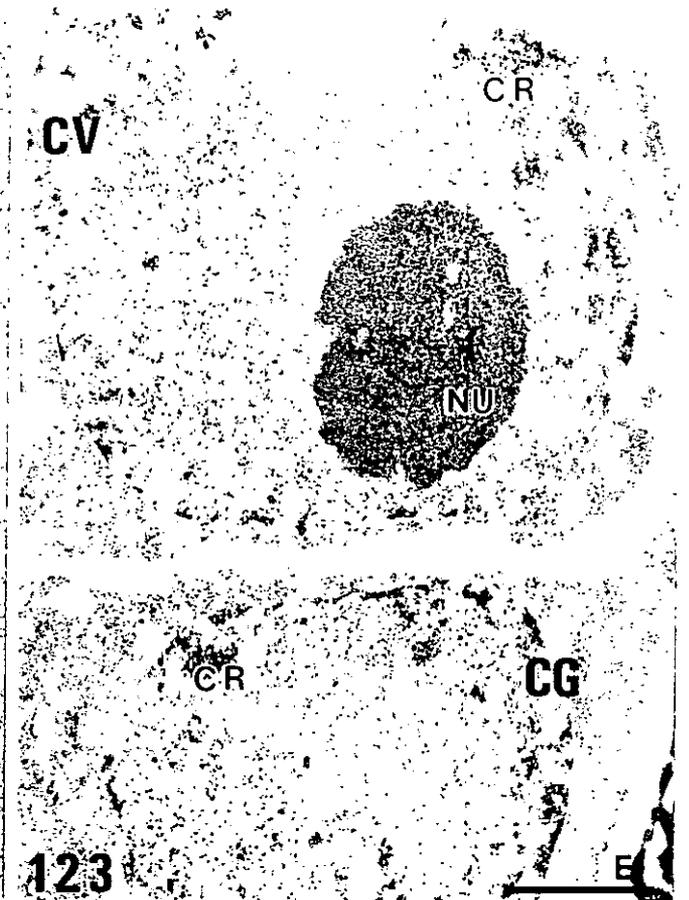
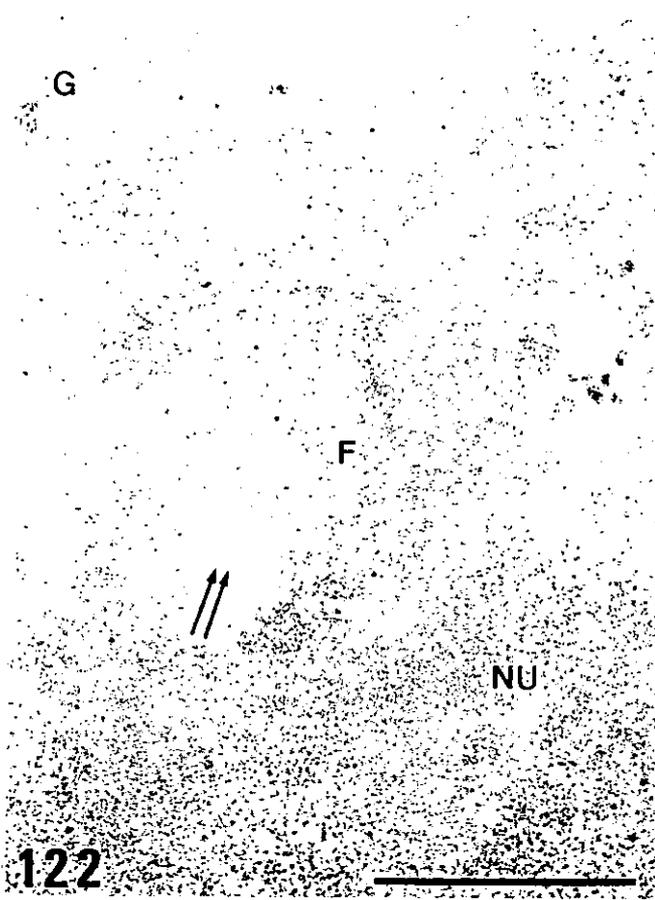
**LÁMINA 44**

Inmunolocalización de la proteína fibrilarina con el anticuerpo B36, en combinación  
con la citoquímica MA

Figuras 122 - 125

LÁMINA 44. Inmunolocalización de la proteína fibrilarina con el anticuerpo B36, en combinación con la citoquímica MA.

**Figuras 122-125:** Regiones nucleares de microspora vacuolada (Fig. 122) y células generativa (Fig. 124) y vegetativa (Fig. 125) de polen bicelular joven (Fig. 123) de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de la proteína fibrilarina. Citoquímica MA realizada en bloque. Las partículas de oro se localizan en todos los casos en el componente fibrilar denso (F) del nucleolo (NU). No hay marcado significativo en otros compartimentos del nucleolo, ni en la región intercromatínica (RI) ni en las masas de cromatina condensada (CR). En figuras 122, 124 y 125, barra = 0.5  $\mu\text{m}$ . En figura 123, barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



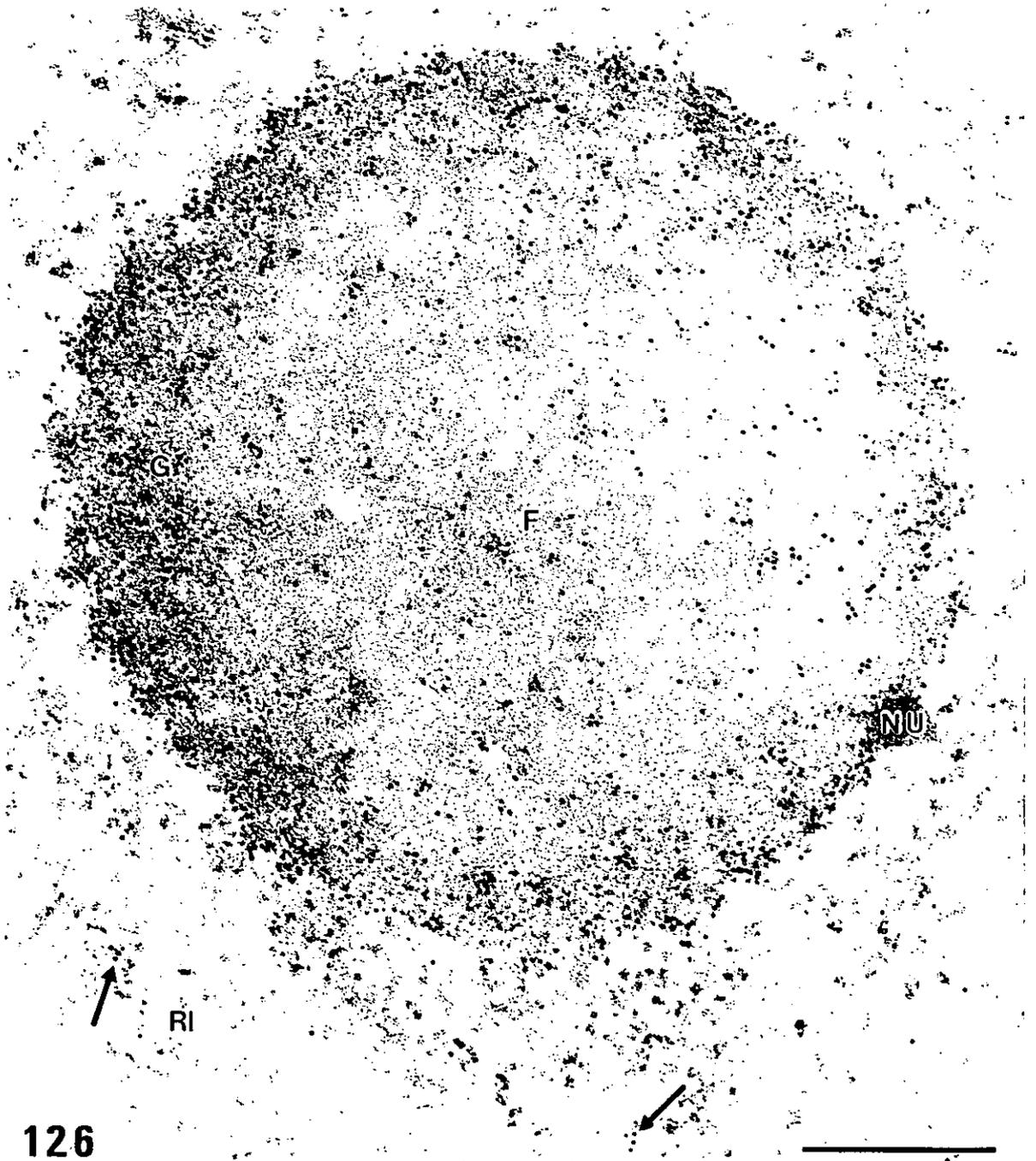
**LÁMINA 45**

Inmunolocalización de RNA en combinación con la citoquímica MA. *Microspora*  
vacuolada

Figuras 126 y 127

LÁMINA 45. Inmunolocalización de RNA en combinación con la citoquímica MA. Microspora vacuolada

**Figuras 126 y 127:** Regiones nucleares de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. Se muestran dos nucleolos (NU) poco activos correspondientes al final de la fase de microspora vacuolada, en los que el componente granular ocupa una posición periférica. Las partículas de oro que localizan RNA marcan el componente fibrilar denso (F) y el granular (G), siendo la intensidad del marcado más alta en este último. Algunas zonas de la región intercromatínica (RI) y el citoplasma (CT) están marcadas. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 46**

Inmunolocalización de RNA en combinación con la citoquímica MA. Potén bicelular

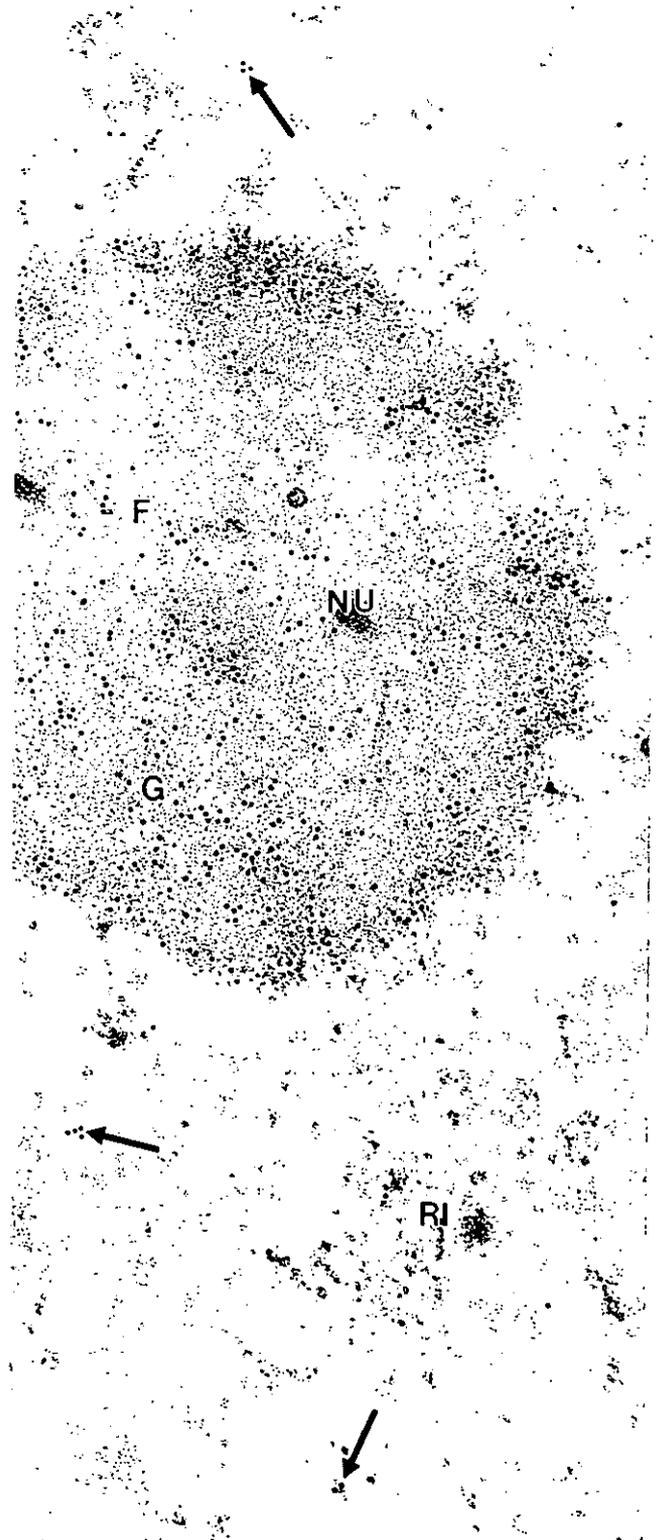
Figuras 128 y 129

LÁMINA 46. Inmunolocalización de RNA en combinación con la citoquímica MA. Polen bicelular.

**Figuras 128 y 129:** Regiones nucleares de las células generativa (**Fig. 128**) y vegetativa (**Fig. 129**) de polen bicelular de *Capsicum annuum* L. Inmunolocalización de RNA. Citoquímica MA realizada en bloque. El nucleolo (NU) generativo (**Fig. 128**) es poco activo, con el componente granular (G) situado en la periferia. Las partículas de oro que localizan RNA marcan el componente fibrilar denso (F) y el granular, siendo la intensidad de marcado más alta en este último. Asimismo se observa un cuerpo nuclear (flecha gruesa) de aspecto fibrilar, que presenta un marcado moderado. El patrón de marcado del nucleolo generativo se repite en el vegetativo (**Fig. 129**), que es más activo, con el componente granular mezclado con el fibrilar denso. Algunas zonas de la región intercromatínica (RI) están marcadas. Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



128



129



**LÁMINA 47**

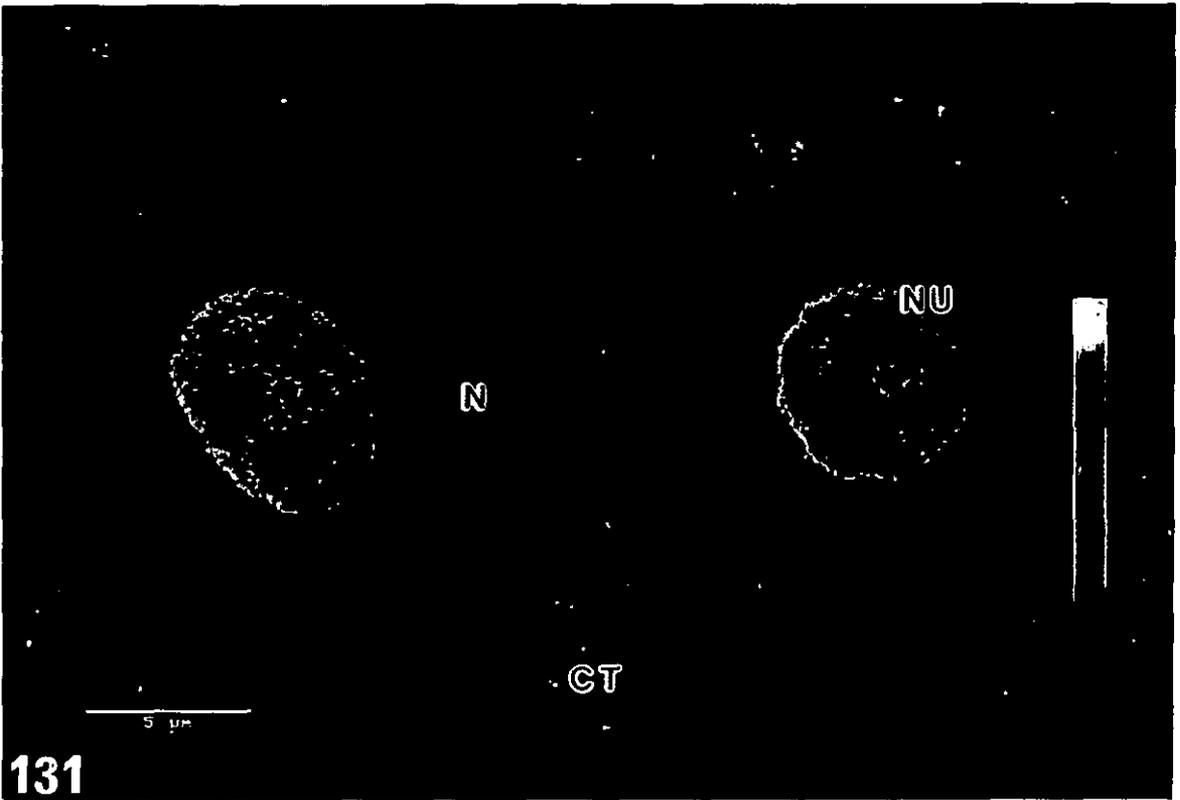
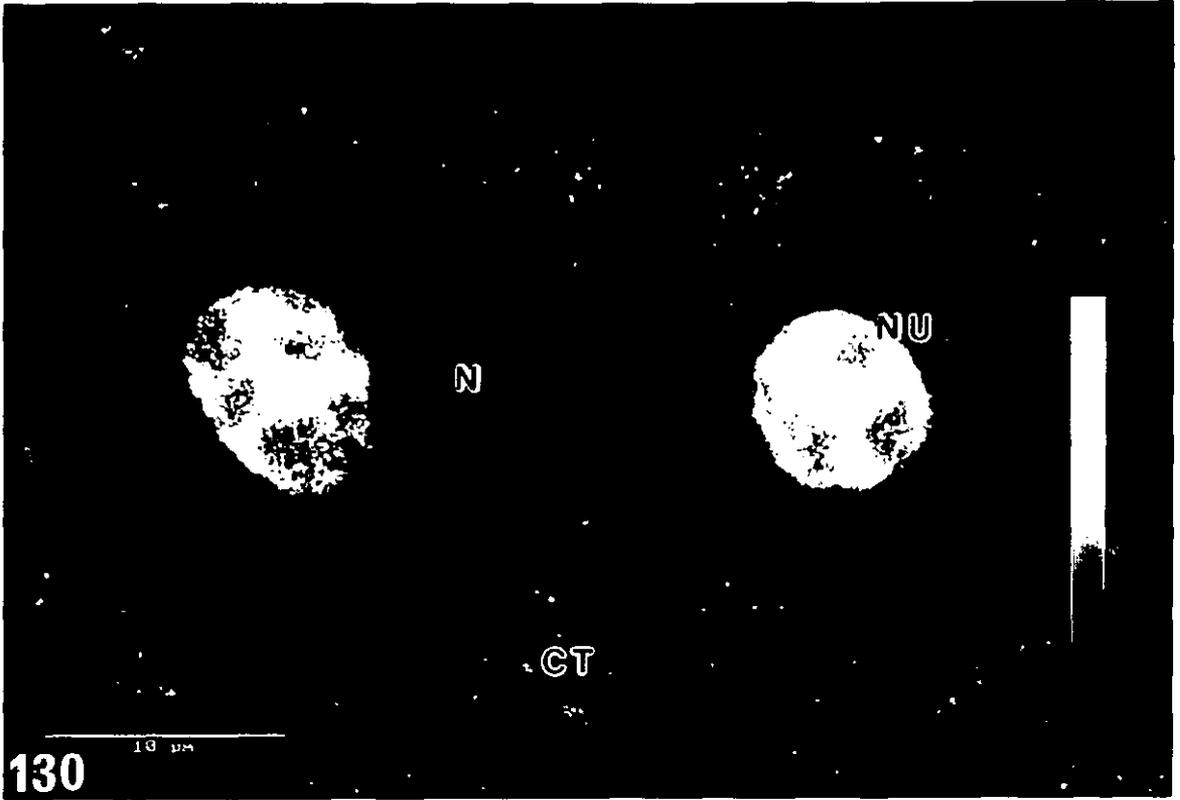
Localización del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína.

Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 130 y 131

LÁMINA 47. Localización del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 130 y 131:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del RNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Proyección de varios planos focales, separados entre sí 1  $\mu\text{m}$ , que cubren la totalidad de dos nucleolos activos. Sin tratamiento de imagen (Fig. 130) se observa una distribución diferencial de la señal fluorescente en los nucleolos (NU). El marcado más intenso (representado por el color blanco en la escala de grises) se localiza en zonas de la periferia e interior del nucleolo. Una señal más débil ocupa el resto del nucleolo. Después de tratamiento de las imágenes (Fig. 131), se puede apreciar mejor la diferente distribución del RNA ribosómico en el nucleolo, transformando la escala de grises de la figura anterior en una escala de color, en la que el color rojo representa una señal elevada, el verde intermedia y el azul baja. El citoplasma (CT) está marcado, aunque menos intensamente que el nucleolo, mientras que el resto del núcleo (N) es negativo.



**LÁMINA 48**

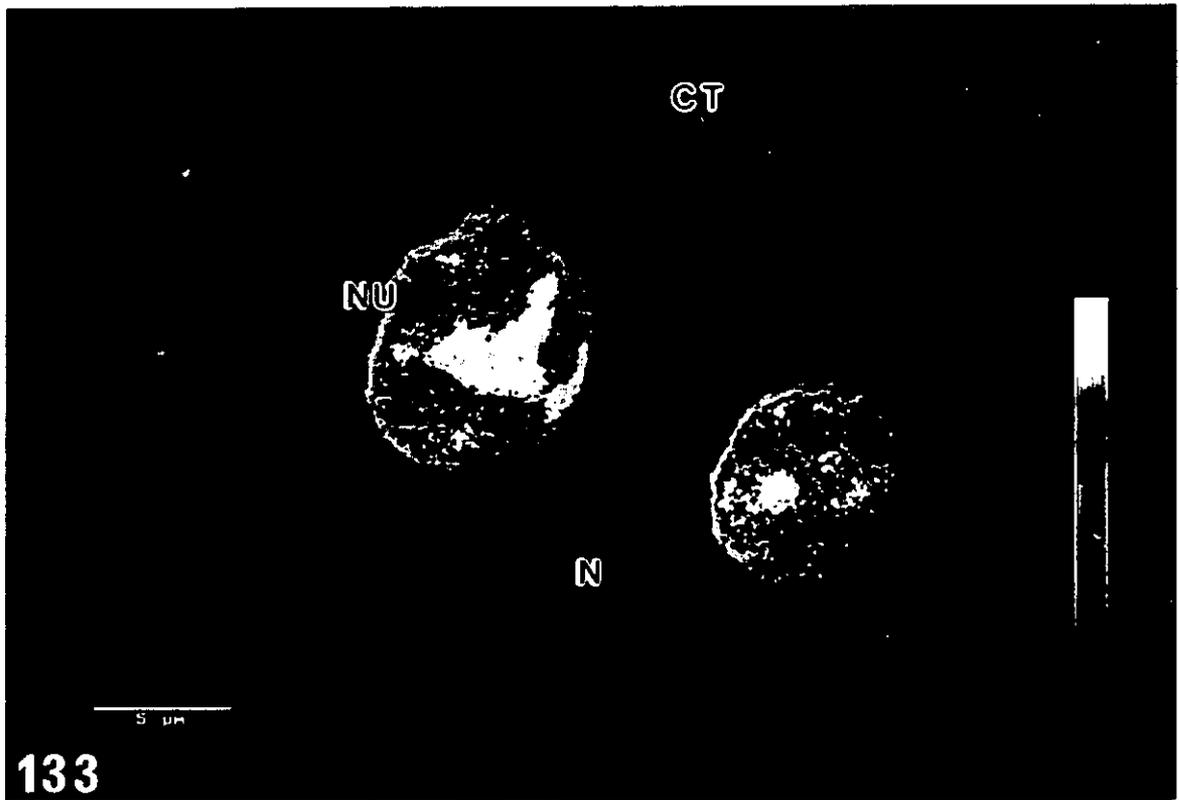
Localización del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 18S de *Raphanus sativus* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína.

Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 132 y 133

LÁMINA 48. Localización del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 18S de *Raphanus sativus* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 132 y 133:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del RNA ribosómico 18S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Proyección de varios planos focales, separados entre sí 1  $\mu\text{m}$ , que cubren la totalidad de los nucleolos. En nucleolos poco activos, sin tratamiento de imagen (Fig. 132), se observa una distribución diferencial de la señal fluorescente en los nucleolos (NU). El marcado más intenso (representado por el color blanco en la escala de grises) se localiza mayoritariamente en la periferia nucleolar. Una señal más débil ocupa el resto del nucleolo. En nucleolos activos, después de tratamiento de las imágenes (Fig. 133), se observa que la señal de fluorescencia más alta, representada por los colores blanco y rojo, se localiza en la periferia e interior del nucleolo. El resto del nucleolo muestra una señal de intensidad intermedia, color verde, o baja, zonas redondeadas de color azul en el interior del nucleolo. El citoplasma (CT) está marcado, aunque menos intensamente que el nucleolo, mientras que el resto del núcleo (N) es negativo.



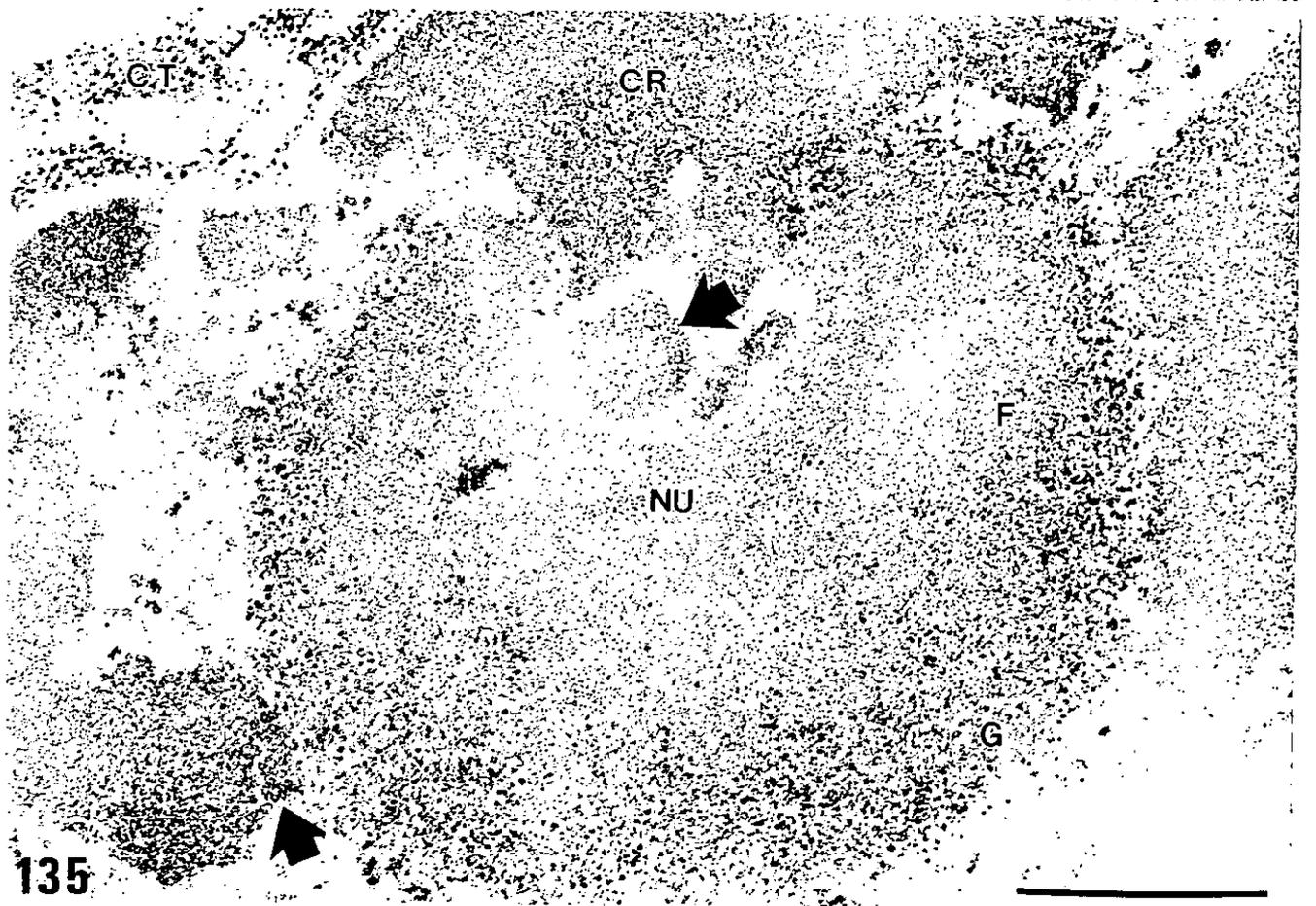
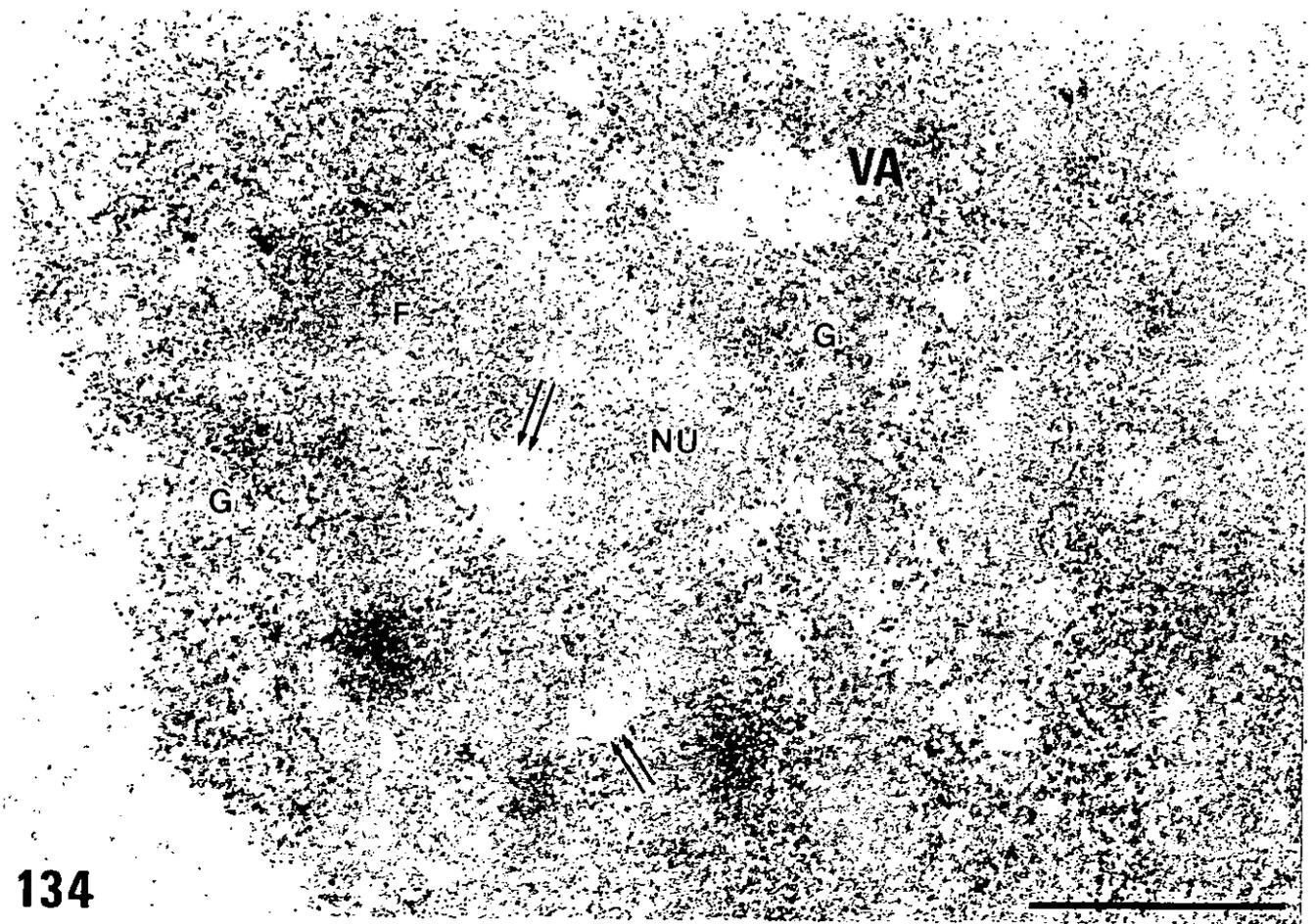
**LÁMINA 49**

Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 134 y 135

LÁMINA 49. Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 134 y 135:** Células meristemáticas de raíces brotadas (Fig. 134) y no brotadas (Fig. 135) de *Allium cepa* L. Localización ultraestructural del RNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Se observa una distribución diferencial del marcado con oro en los distintos componentes del nucleolo (NU), tanto en nucleolos activos (Fig. 134) como inactivos (Fig. 135). El componente granular (G) está más intensamente marcado que el fibrilar denso (F), que muestra una señal moderada. La periferia de algunos centros fibrilares homogéneos (doble flecha) está marcada. La comparación entre las figuras 134 y 135 muestra claramente la distinta organización en nucleolos activos e inactivos. En los nucleolos activos (Fig. 134) aparecen numerosos centros fibrilares homogéneos así como vacuolas de actividad (VA) asociadas al componente granular, que en este tipo de nucleolos está entremezclado con el componente fibrilar denso. En cambio los nucleolos inactivos (Fig. 135) están constituidos mayoritariamente por componente fibrilar denso, con una fina capa periférica de componente granular. Se observan masas de cromatina condensada (flechas gruesas) en contacto o en el interior del nucleolo, que probablemente representan la cromatina ribosómica inactiva. Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



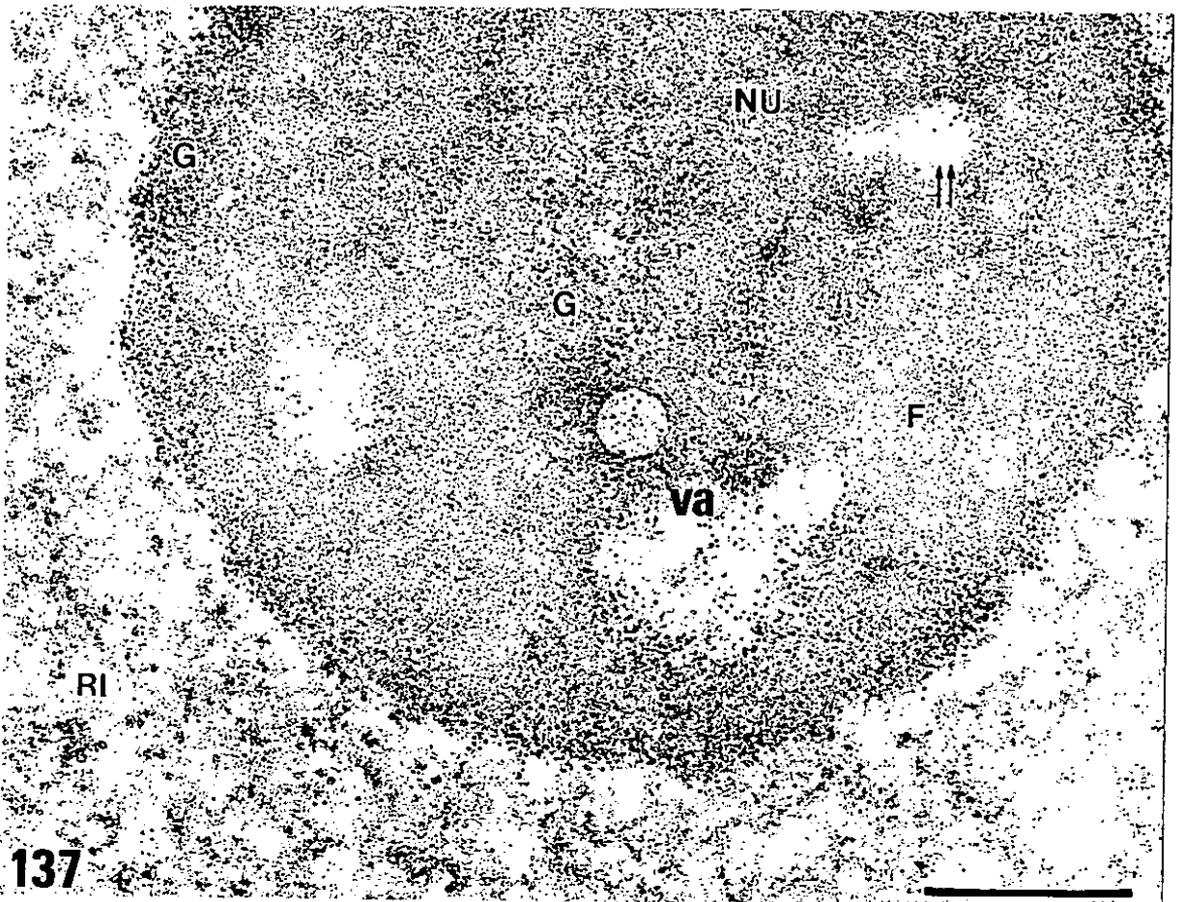
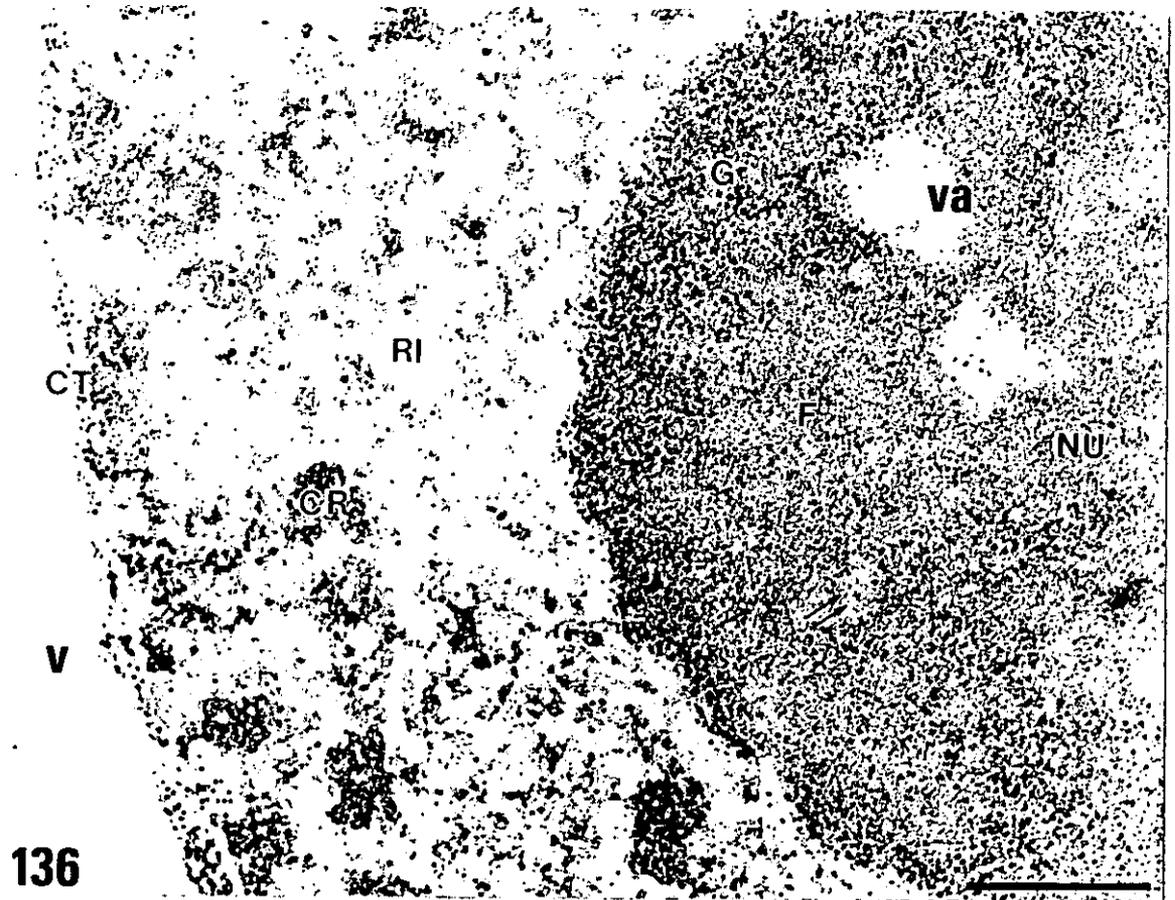
**LÁMINA 50**

Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Microspora vacuolada de *Capsicum annuum* L.

Figuras 136 y 137

LÁMINA 50. Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Microspora vacuolada de *Capsicum annuum* L.

**Figuras 136 y 137:** Microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Localización ultraestructural del RNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Se observa una distribución diferencial del marcado con oro en los distintos componentes del nucleolo (NU) en estas dos imágenes que corresponden a distintos momentos del desarrollo de la microspora vacuolada en los que el nucleolo es activo. El componente granular (G) está más intensamente marcado que el fibrilar denso (F), que muestra una señal moderada. Las vacuolas de actividad (VA) también presentan señal. La periferia de algunos centros fibrilares homogéneos (doble flecha) está marcada y en ocasiones se pueden ver fibras marcadas que penetran hacia el interior del centro fibrilar. En la región intercromatínica (RI) se observa un marcado disperso, mientras que las masas de cromatina condensada (CR), más grandes y numerosas en el estadio representado en la fig. 136 que en el que se muestra en la fig. 137, no están marcadas, al igual que la vacuola citoplásmica (V). Las regiones ricas en ribosomas del citoplasma (CT) están marcadas. Barra = 0.5  $\mu$ m.



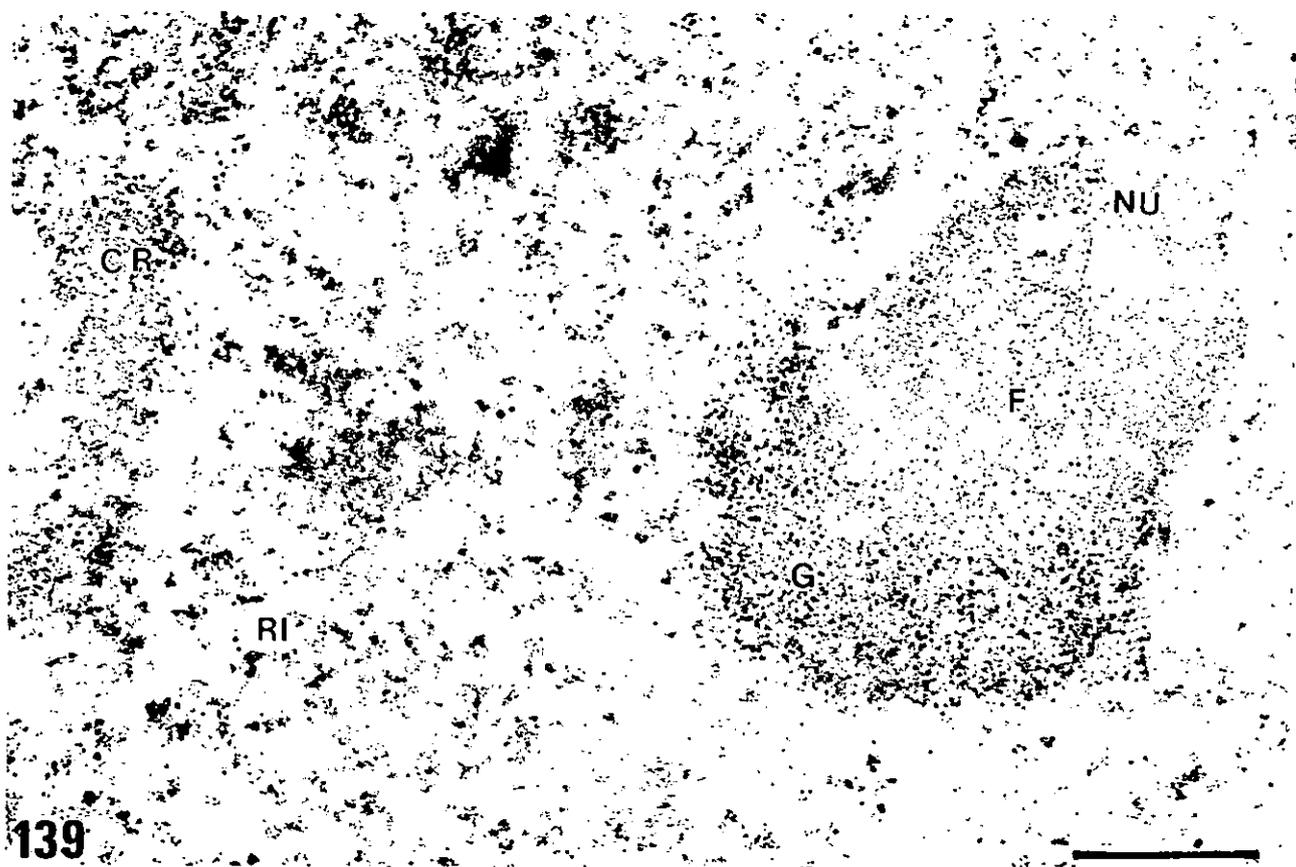
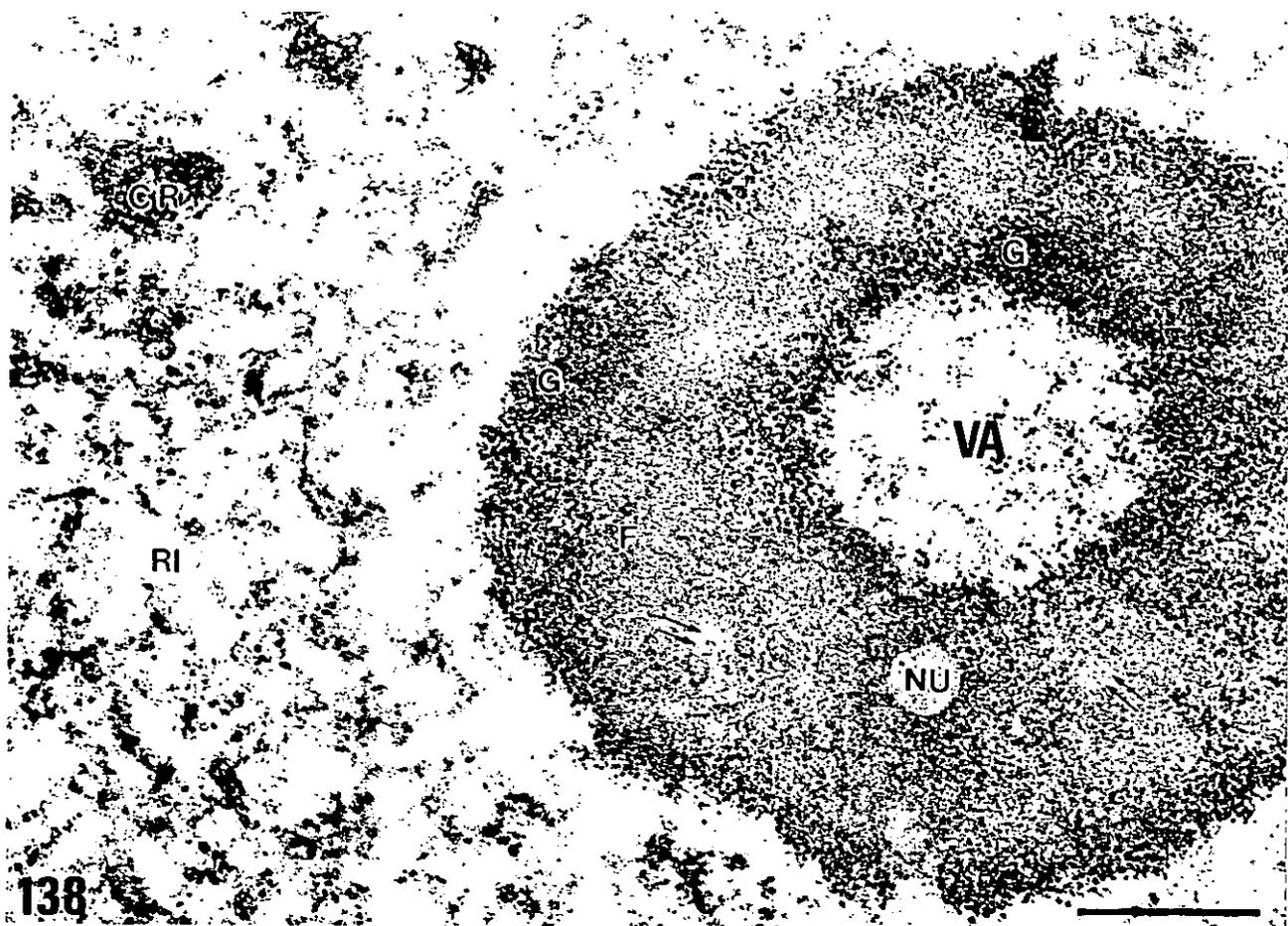
**LÁMINA 51**

Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L.

Figuras 138 y 139

LÁMINA 51. Localización ultraestructural del RNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA antisense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos-conjugados con oro. Polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L.

**Figuras 138 y 139:** Células vegetativa (Fig. 138) y generativa (Fig. 139) de polen bicelular joven de *Capsicum annuum* L. Localización ultraestructural del RNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Se observa una distribución diferencial del marcado con oro en los distintos componentes del nucleolo (NU). El componente granular (G) está más intensamente marcado que el fibrilar denso (F), que muestra una señal moderada. Las vacuolas de actividad (VA) también presentan señal. La periferia de algunos centros fibrilares homogéneos (doble flecha) está marcada. En la región intercromatínica (RI) se observa un marcado disperso, que es más intenso en el núcleo generativo (Fig. 139). El nucleolo vegetativo muestra una morfología reflejo de un estado de alta actividad transcripcional, con una gran vacuola de actividad y centros fibrilares de tipo homogéneo; en cambio el generativo está inactivo y muestra una morfología segregada típica de este estado, con el componente fibrilar denso rodeado por el componente granular. Las masas de cromatina condensada (CR), no están marcadas. Barra = 0.5  $\mu$ m.



**LÁMINA 52**

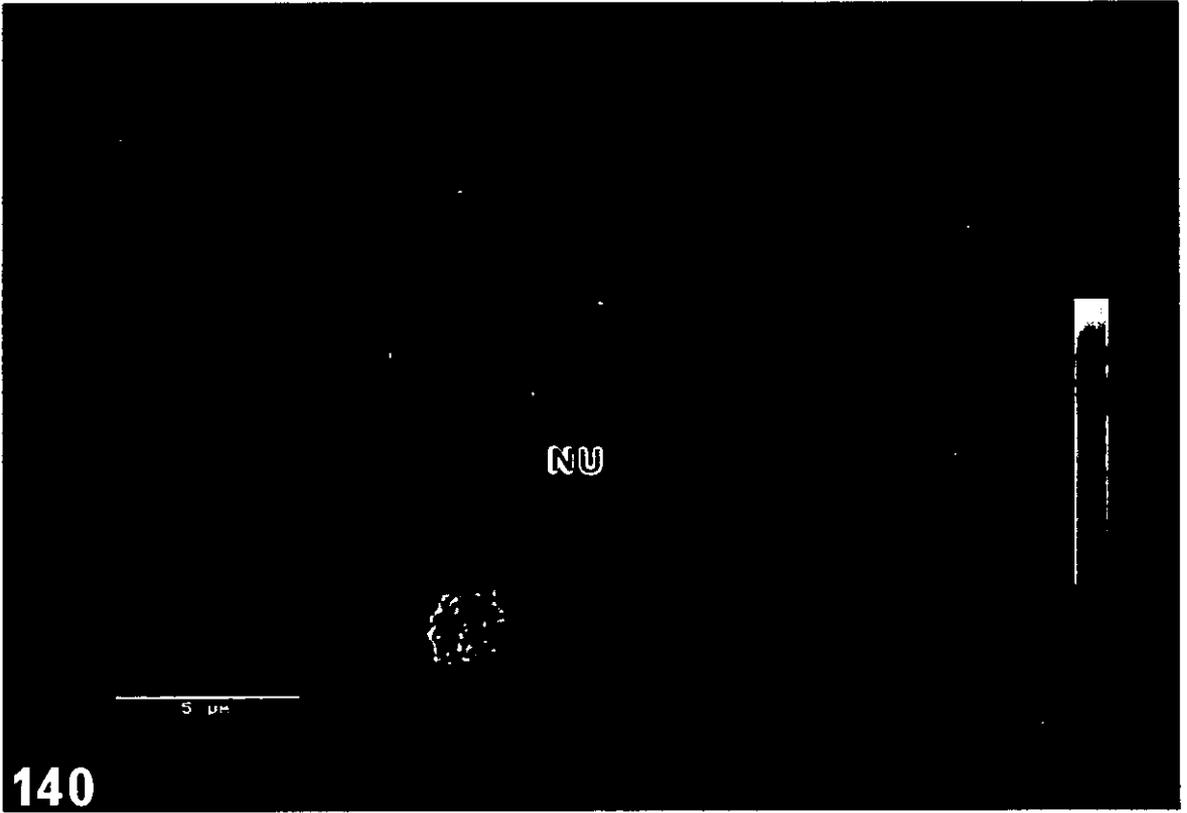
Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína.

Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

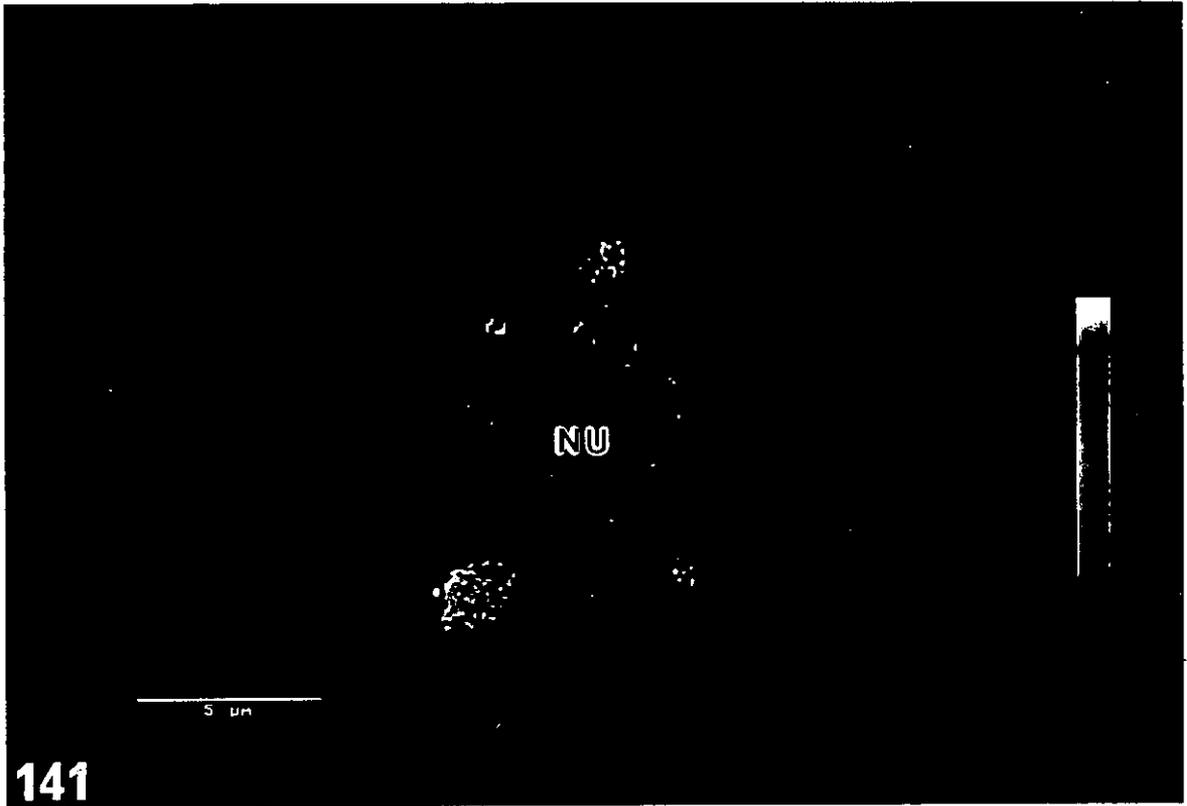
Figuras 140 y 141

LÁMINA 52. Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digóxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 140 y 141:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Imágenes de planos focales consecutivos, separados entre sí 1µm, de un núcleo activo en transcripción ribosómica. Se ha realizado tratamiento de imagen para transformar la escala de grises en una escala de color. En el interior de nucleolo (NU) se observan amplias zonas reticuladas con baja intensidad de fluorescencia, reveladas por el color azul y otras más discretas que presentan una señal intermedia. En contacto con el nucleolo se localizan masas de aspecto redondeado, en las que se encuentra la mayor intensidad de fluorescencia.



140



141

**LÁMINA 53**

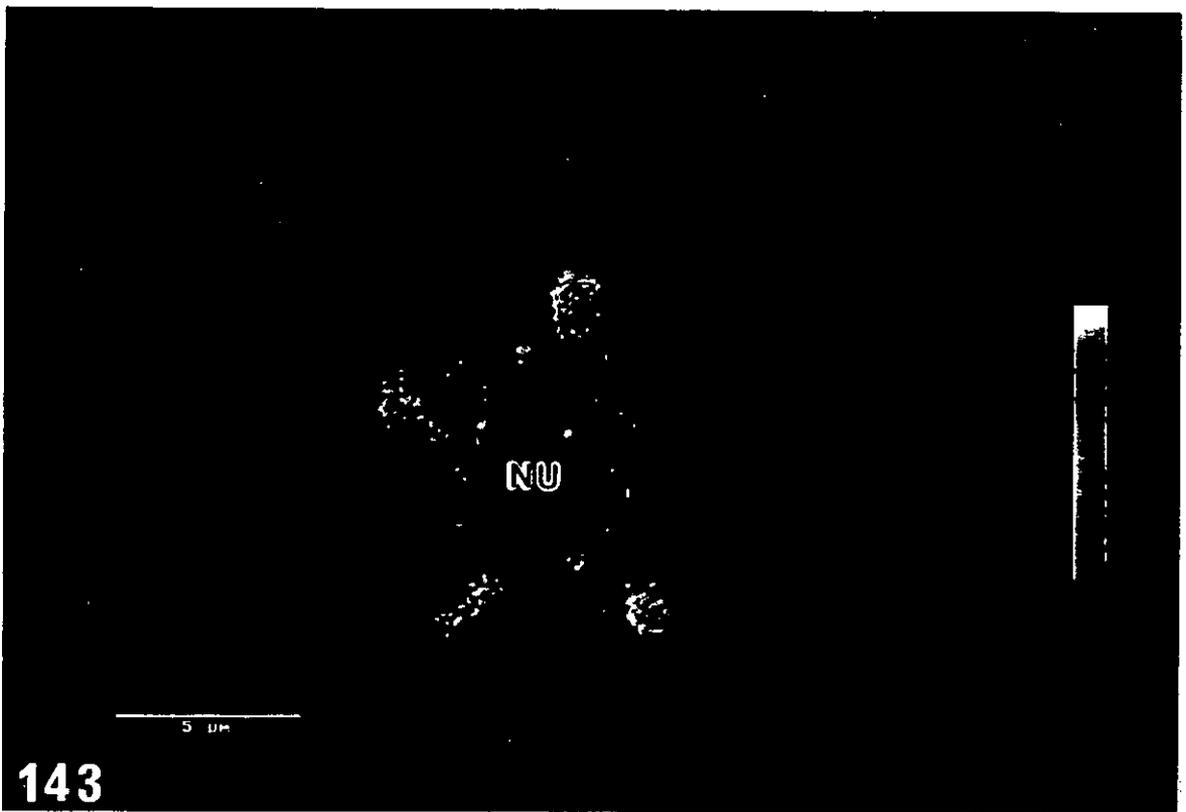
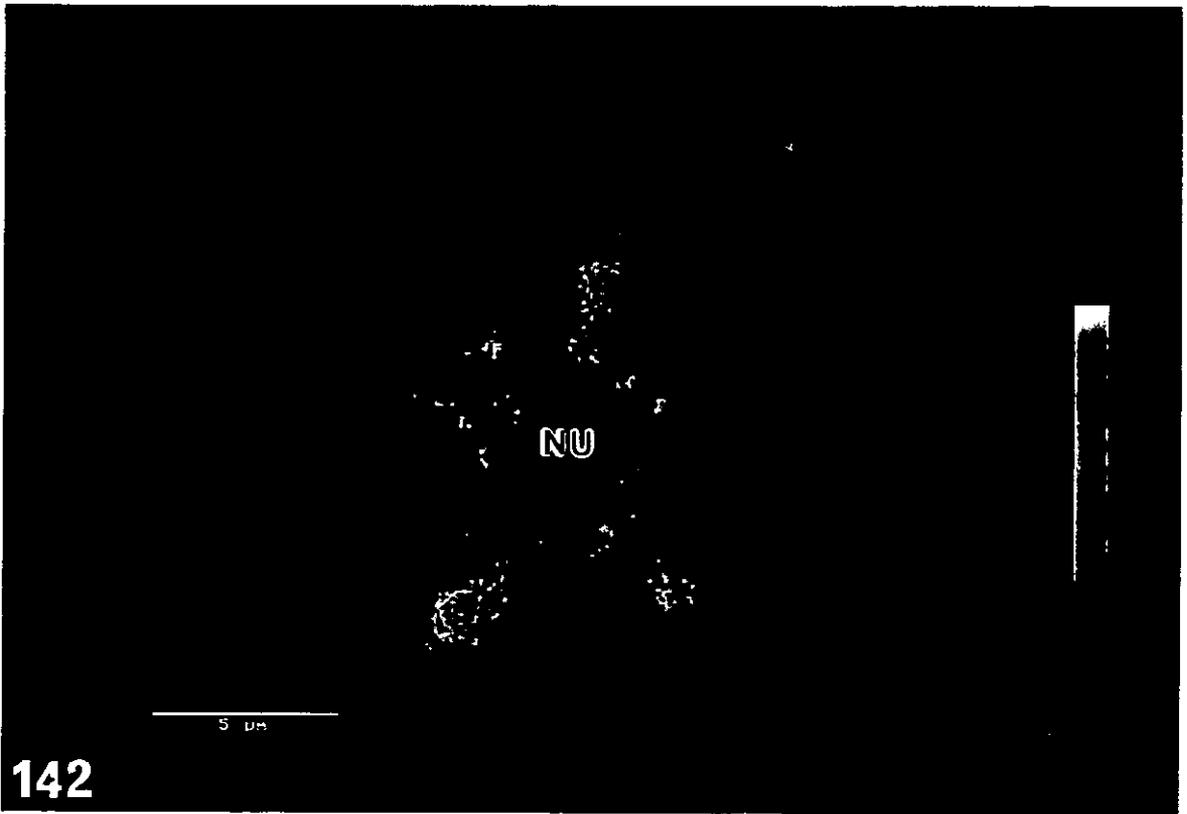
Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína.

Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 142 y 143

LÁMINA 53. Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 142 y 143:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Imágenes de planos focales consecutivos de un núcleo activo en transcripción ribosómica, tratadas para transformar la escala de grises en una escala de color. Secciones ópticas centrales, separadas entre sí 1  $\mu\text{m}$ , del mismo núcleo mostrado en la Lámina 52. En el interior de nucleolo (NU) se sigue observando la red de aspecto fibrilar de baja señal (color azul) en la que se distinguen claramente pequeñas áreas que muestran una intensidad de fluorescencia intermedia (color verde). En contacto con el nucleolo se localizan masas de mayor intensidad de fluorescencia.



**LÁMINA 54**

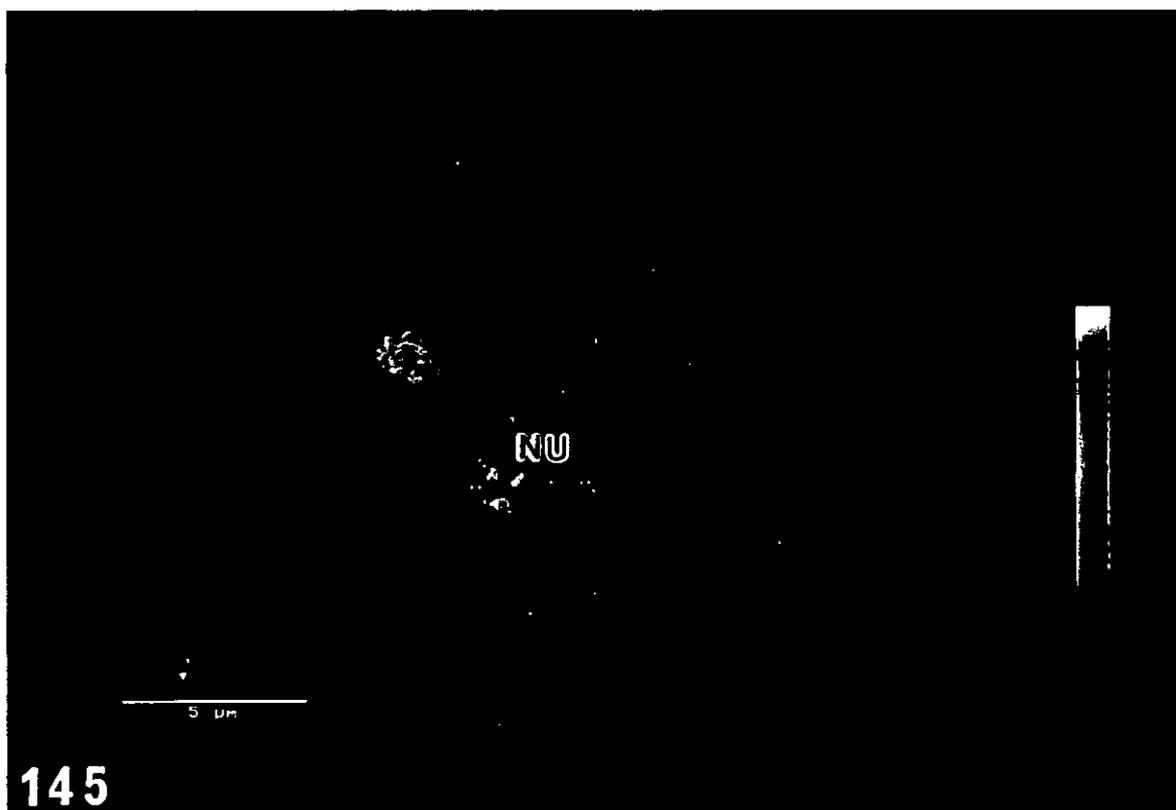
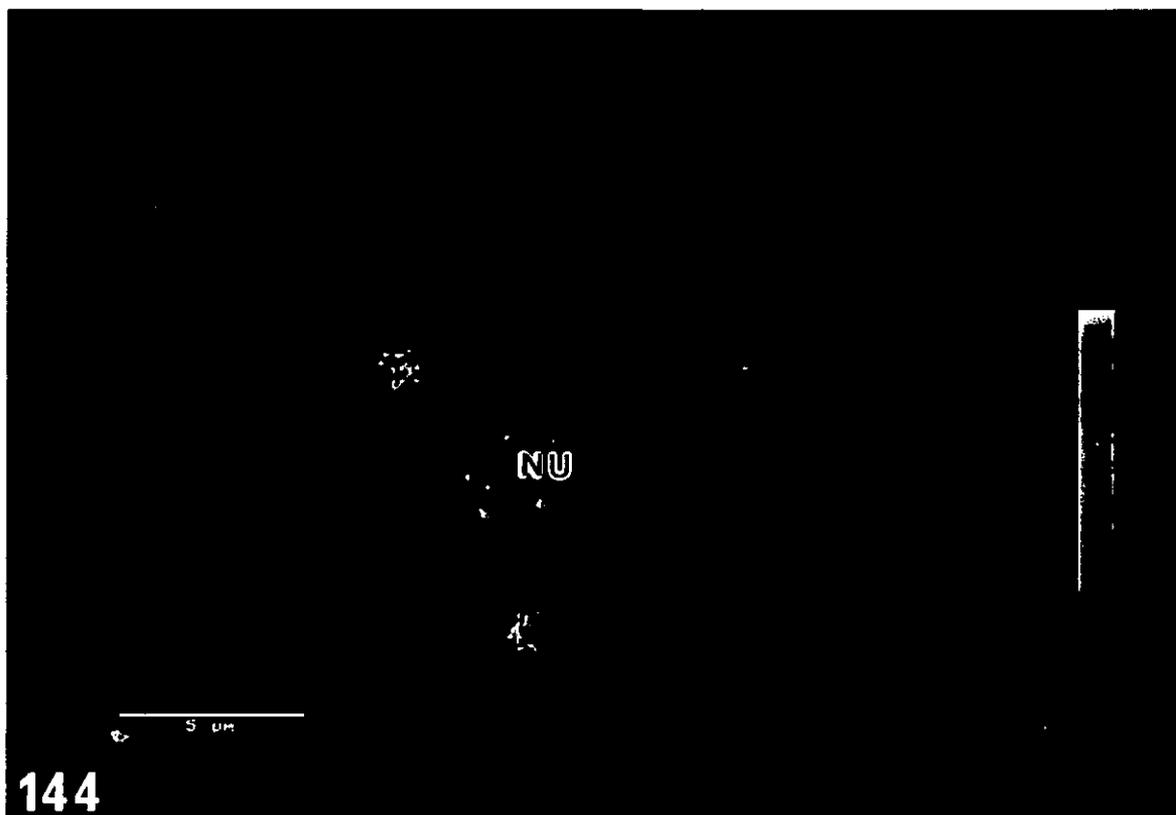
Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína.

Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 144 y 145

LÁMINA 54. Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 144 y 145:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Imágenes de planos focales consecutivos de un núcleo activo en transcripción ribosómica, tratadas para transformar la escala de grises en una escala de color. Secciones ópticas, separadas entre sí 1  $\mu\text{m}$ , del mismo núcleo mostrado en las Láminas 52 y 53. En el interior de nucleolo (NU) se sigue observando la red de aspecto fibrilar de baja señal de fluorescencia (color azul) en la que se distinguen claramente pequeñas áreas que muestran una intensidad de fluorescencia intermedia (color verde). En contacto con el nucleolo se localizan masas de cromatina condensada, de mayor intensidad de fluorescencia.



**LÁMINA 55**

Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

Figuras 146 y 147

LÁMINA 55. Localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ*. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con fluoresceína. Microscopía confocal. Meristemo radicular de *Allium cepa* L.

**Figuras 146 y 147:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal. Proyecciones de planos focales consecutivos de un nucleolo activo (**Fig. 146**) y otro poco activo (**Fig. 147**). Tratamiento de imagen para transformar la escala de grises en una escala de color. En nucleolos (NU) activos la señal de fluorescencia que revela el DNA ribosómico es baja o intermedia mientras que en nucleolos poco activos aparecen numerosas inclusiones de intensidad de fluorescencia elevada. En ambos casos en contacto con el nucleolo se localizan masas, de intensidad de fluorescencia similar a la encontrada en el interior de los nucleolos poco activos.

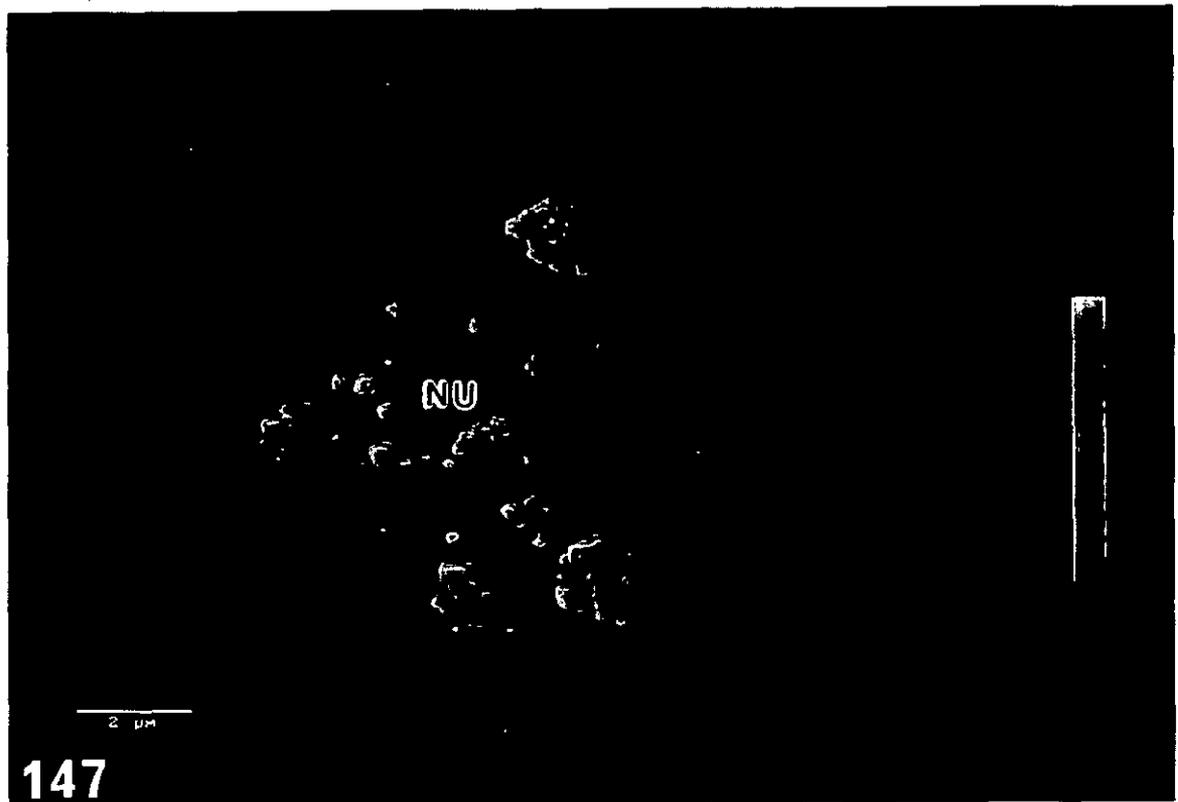
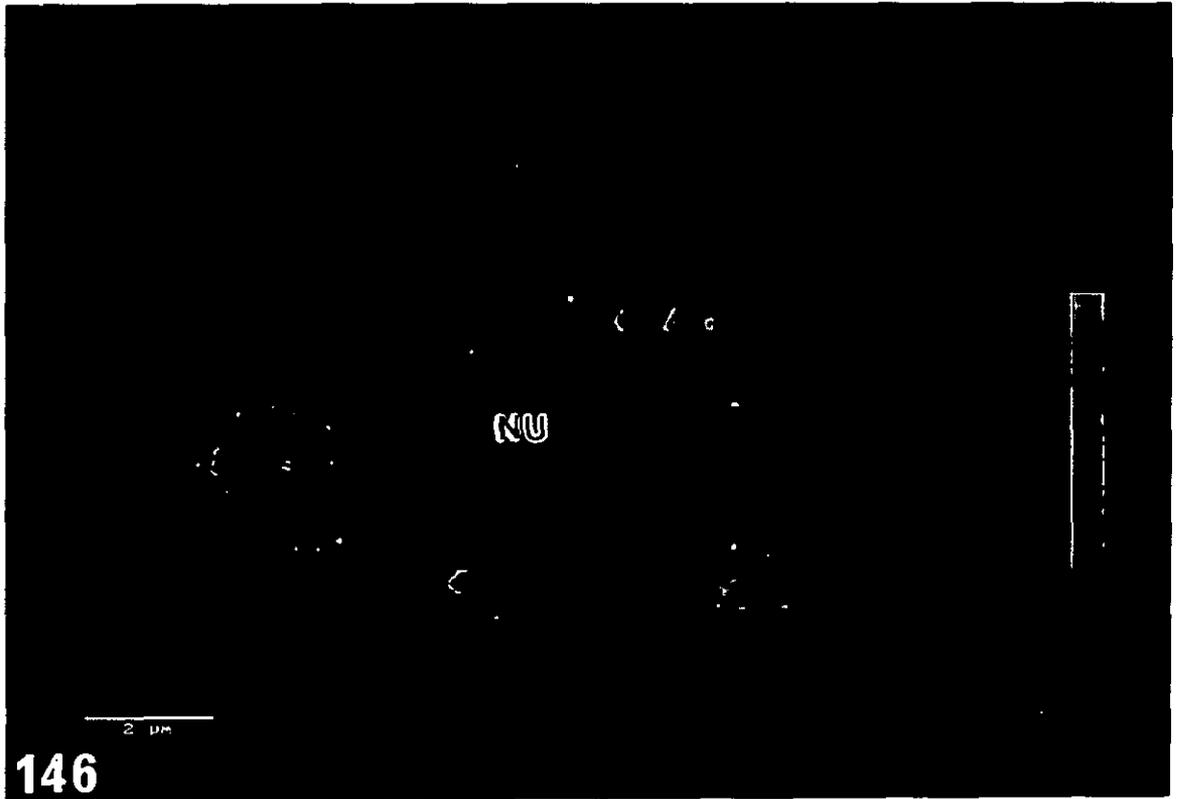


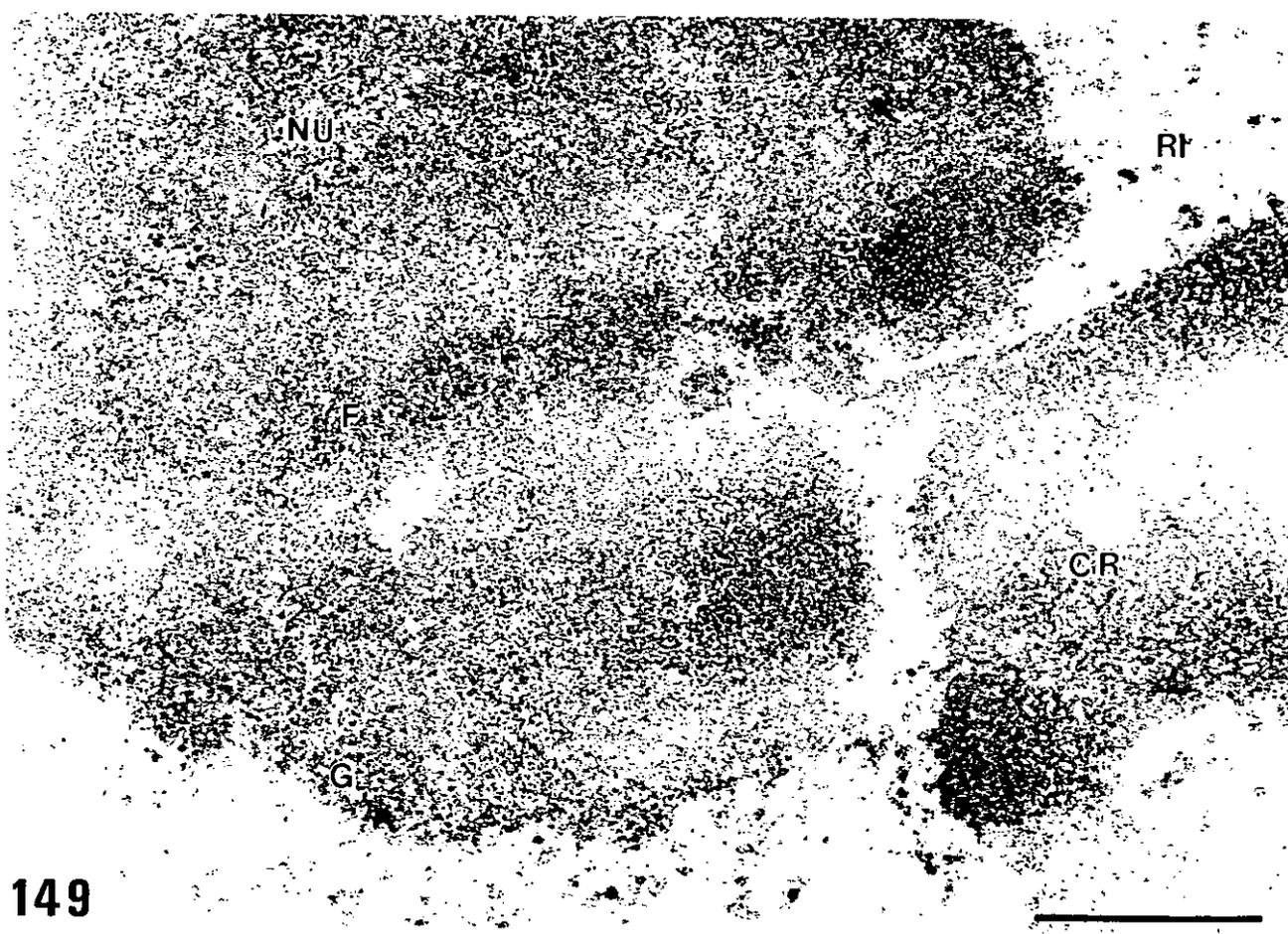
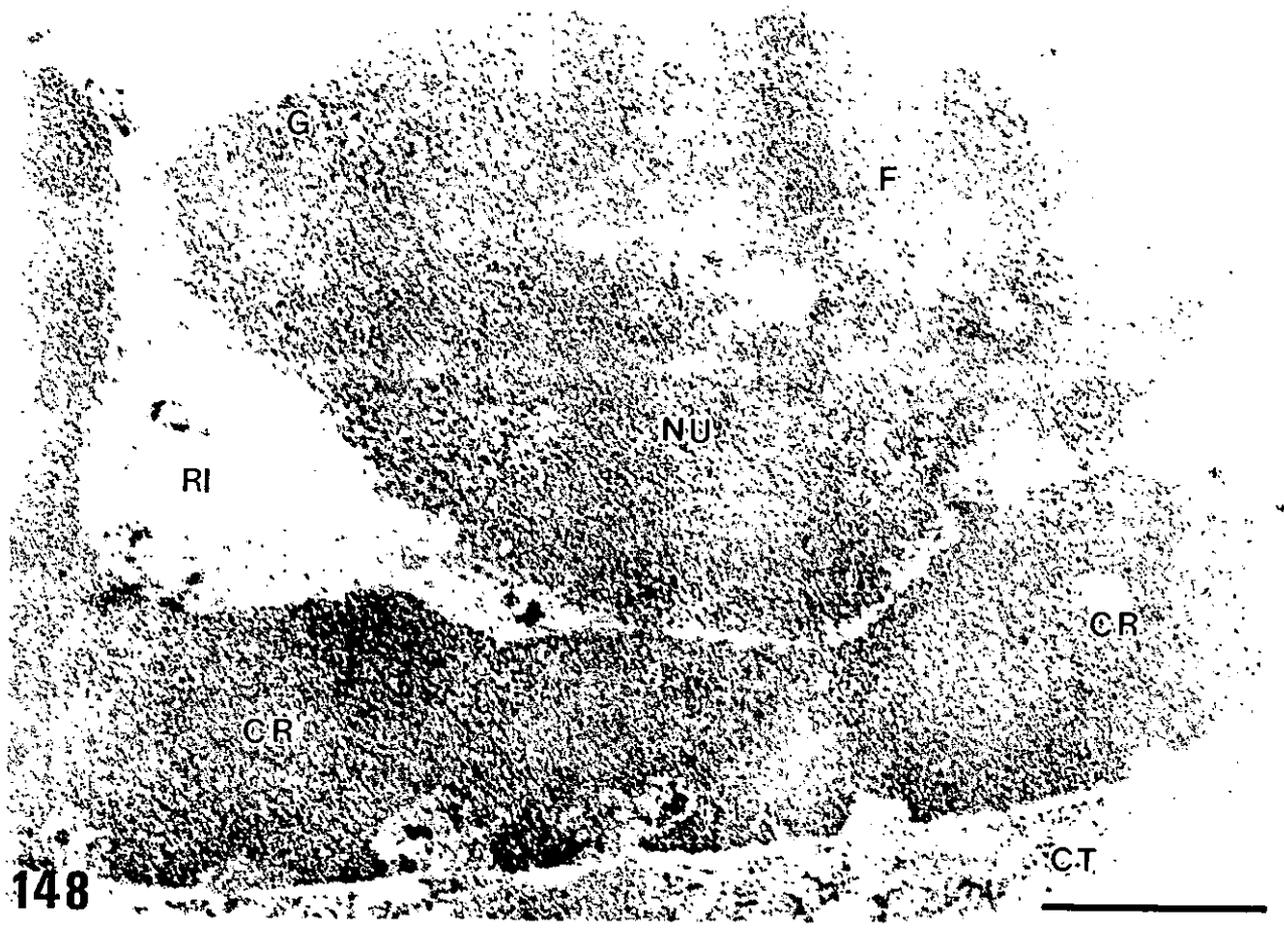
LÁMINA 56

Localización ultraestructural del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Células meristemáticas de raíces no brotadas de *Allium cepa* L.

Figuras 148 y 149

LÁMINA 56. Localización ultraestructural del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Células meristemáticas de raíces no brotadas de *Allium cepa* L.

**Figuras 148 y 149:** Células meristemáticas de raíces no brotadas de *Allium cepa* L. Localización ultraestructural del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Imágenes de nucleolos (NU) inactivos en los que el marcado que localiza el DNA ribosómico se encuentra en zonas del componente fibrilar denso (F), mientras que el granular (G) no presenta marcado. Las masas de cromatina condensada (CR) en estrecho contacto con el nucleolo también están marcadas. No se observan partículas de oro en la región intercromatínica (RI). Barra = 0.5  $\mu$ m.



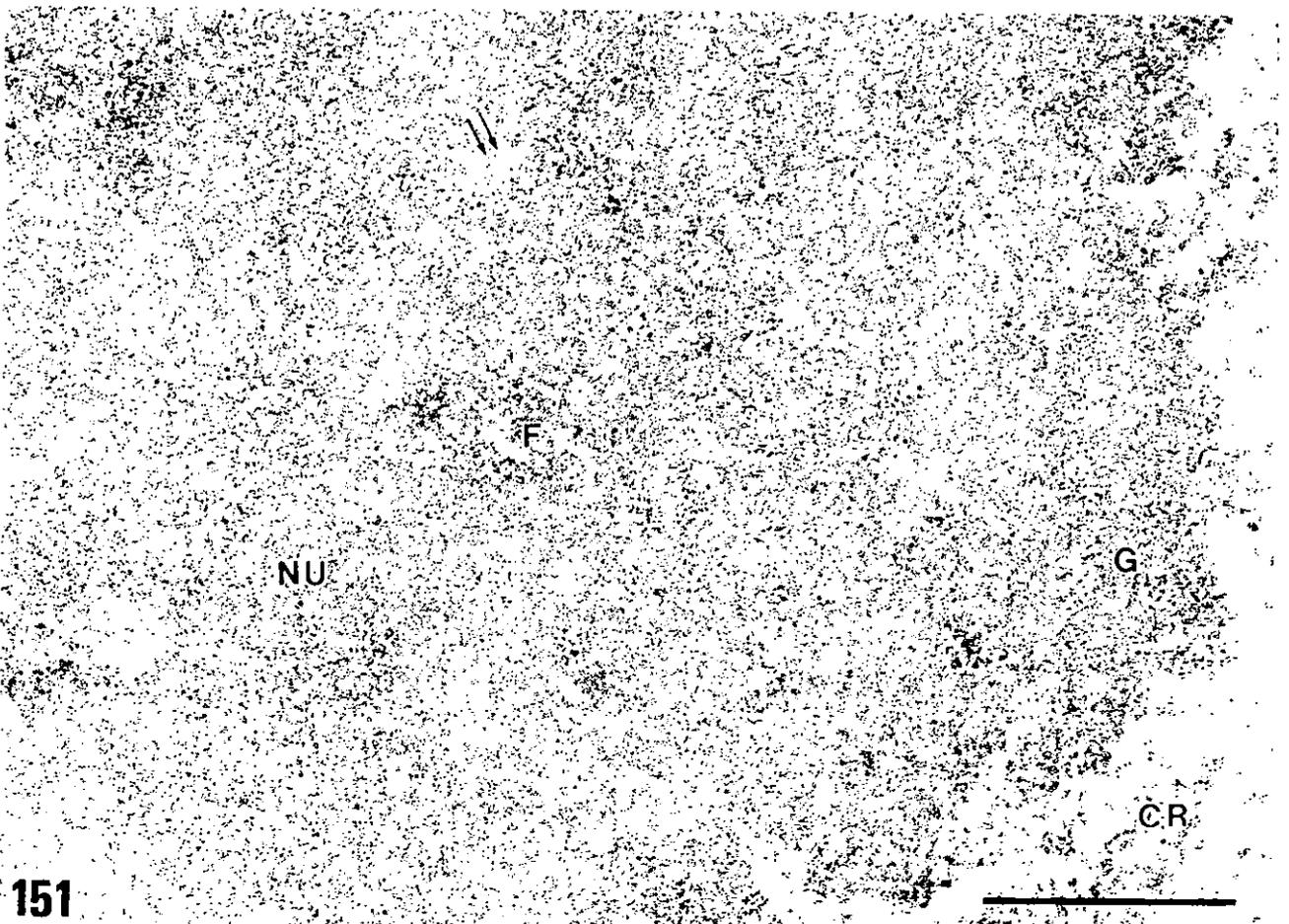
**LÁMINA 57**

Localización ultraestructural del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L.

Figuras 150 y 151

LÁMINA 57. Localización ultraestructural del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ* en combinación con la citoquímica MA. Sonda RNA sense correspondiente a un fragmento del DNA ribosómico 25S de *Arabidopsis thaliana* L. marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos conjugados con oro. Células meristemáticas de raíces no brotadas de *Allium cepa* L.

**Figuras 150 y 151:** Células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Localización ultraestructural del DNA ribosómico 25S mediante hibridación *in situ*. Citoquímica MA realizada en bloque. Imágenes de nucleolos (NU) activos en los que el marcado que localiza el DNA ribosómico se encuentra en zonas del componente fibrilar denso (F) mientras que el componente granular (G) no presenta marcado. No se observan partículas de oro en la región intercromatínica (RI). Centros fibrilares homogéneos: doble flecha; centros fibrilares heterogéneos: cabeza de flecha. Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ .



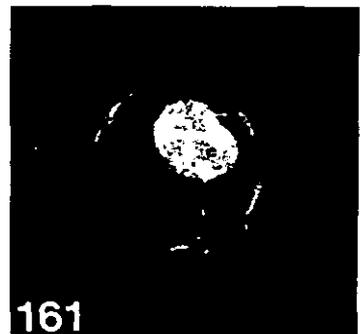
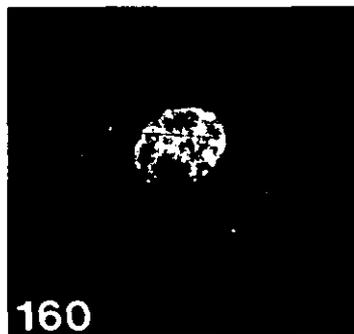
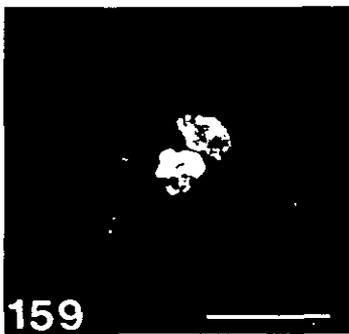
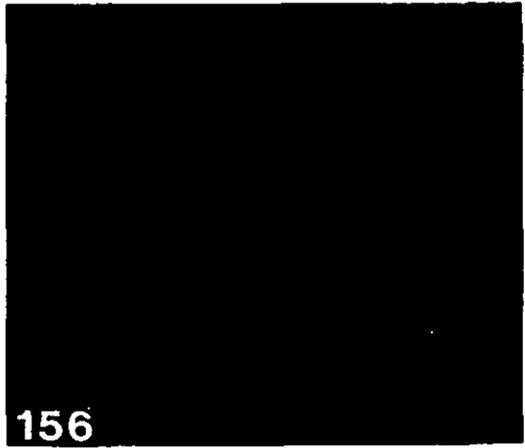
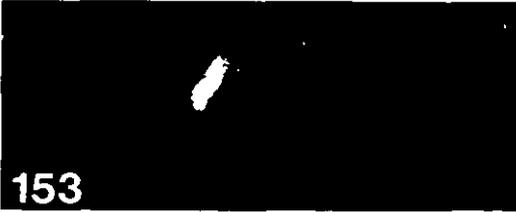
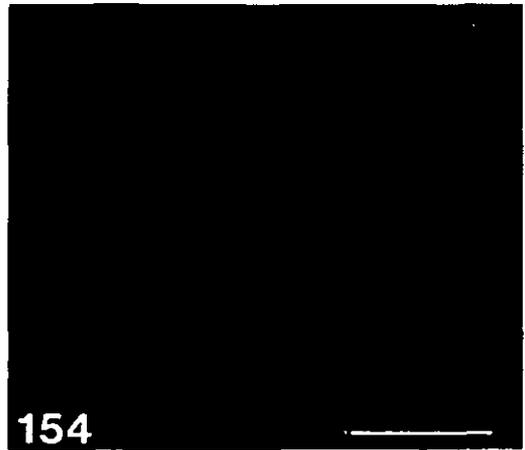
**LÁMINA 58**

Primeras fases del proceso de embriogénesis a partir de micosporas vacuoladas de  
*Capsicum annuum* L. Tición con DAPI.

Figuras 152 - 161

LÁMINA 58. Primeras fases del proceso de embriogénesis a partir de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Tición con DAPI en aplastados.

**Figuras 152-161:** Primeras fases del proceso de embriogénesis a partir de microsporas vacuoladas de *Capsicum annuum* L. Tición con DAPI. Microsporas vacuoladas en el momento de la puesta en cultivo (Figs. 152 y 153). Grano de polen bicelular atípico tras dos días de cultivo (Fig. 154 y 159) en el que se observan dos núcleos con el mismo patrón de condensación de la cromatina. A partir del décimo día de cultivo empiezan a aparecer granos de polen multinucleados (Figs. 155 y 156) que se desarrollan dando lugar a proembriones con varios núcleos (Figs. 157 y 158). Ocasionalmente se encontraron a los pocos días de iniciado el cultivo, granos de polen que presentaban un único núcleo (Figs. 160 y 161) de tamaño equivalente a dos núcleos de granos de polen bicelulares atípicos (Fig. 159). Barra = 10  $\mu$ m.



**LÁMINA 59**

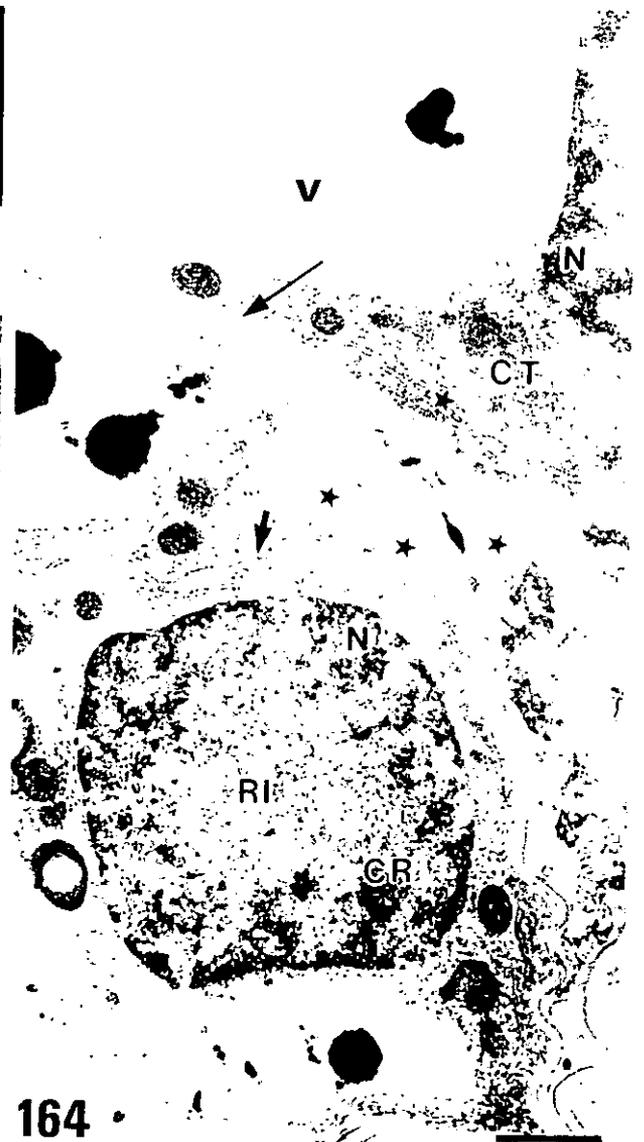
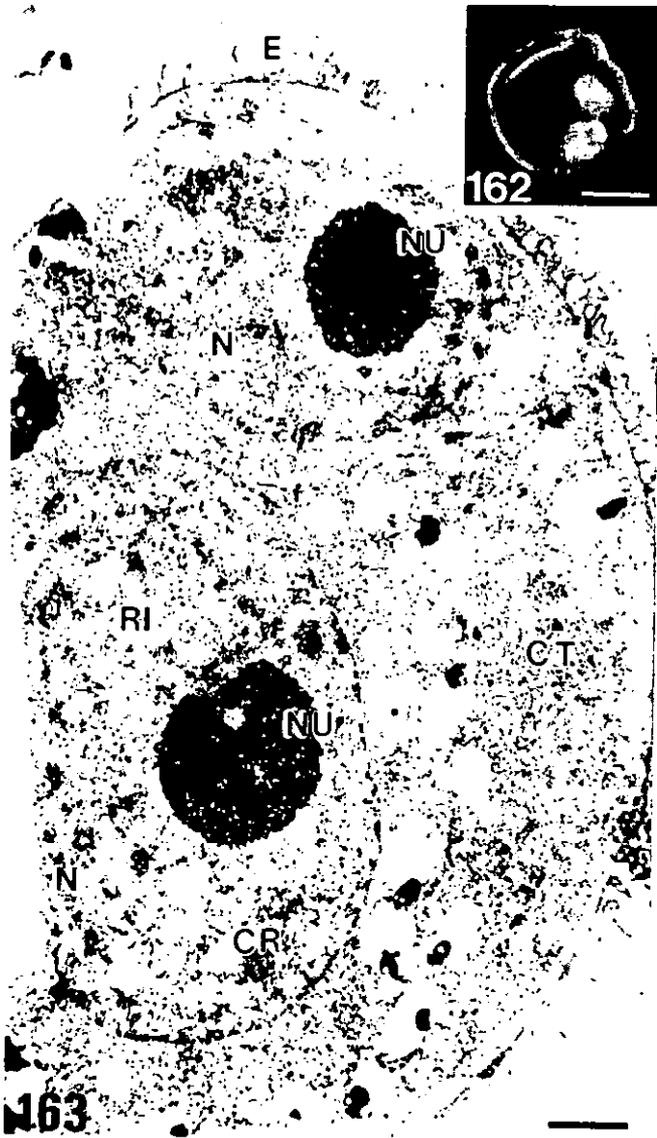
Apectos ultraestructurales del polen embriogénico. Inclusión en Epon y tinción con uranilo y plomo.

Figuras 162 - 164

LÁMINA 59. Aspectos ultraestructurales del polen embriogénico. Inclusión en Epon y tinción con uranilo y plomo.

**Figuras 163 y 164:** Polen embriogénico en el estado de dos (Fig. 163) y cuatro células (Fig. 164). En la fig. 163, los dos núcleos (N) presentan el mismo estado de condensación de la cromatina con pequeñas y abundantes masas de cromatina condensada (CR) y una rica región intercromatínica (RI). Los nucleolos (NU) muestran una morfología semejante. El citoplasma (CT) es rico en orgánulos y la vacuola está reducida. En el estado de cuatro células (Fig. 164), los núcleos muestran unas características semejantes a las descritas en la figura anterior y el citoplasma (CT) es rico en orgánulos. El grosor de las paredes (flechas) que separan células formadas en distintos ciclos de división es diferente. Las estrellas señalan células diferentes en un mismo grano de polen embriogénico. Se observan depósitos electron densos en el interior de las vacuolas citoplásmicas. Barra = 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 162:** Aspecto de un grano de polen bicelular atípico tras tinción con DAPI y observación bajo luz ultravioleta. Se observan dos núcleos con la misma intensidad de fluorescencia. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



# DISCUSIÓN

## 1. VENTAJAS DE LAS CRIOTÉCNICAS

Las técnicas de procesamiento convencional de muestras para microscopía electrónica son muy útiles para estudios ultraestructurales. Sin embargo la sola descripción morfológica de estructuras no permite profundizar en el estudio de la función celular. Para ello se han desarrollado varias técnicas de inmunodetección in situ de moléculas cuya localización sobre determinadas estructuras permite establecer relaciones estructura-función. Son pocos los estudios inmunocitoquímicos realizados sobre cortes ultrafinos de material procesado convencionalmente, utilizando resinas epoxi como Epon, ya que las altas temperaturas a las que polimerizan estas resinas hace que en la mayoría de los casos se pierda la antigenicidad de la muestra. Además estas resinas suelen ser de naturaleza hidrófoba, dificultando el acceso de las soluciones a las muestras, lo cual supone un impedimento adicional para experimentos de inmunomarcado.

El desarrollo de las criotécnicas ha hecho posible conseguir simultáneamente una buena preservación ultraestructural y la conservación de la reactividad antigénica y química necesarias para llevar a cabo estudios inmunocitoquímicos y de hibridación in situ (Hernández-Verdun y col., 1991). Las criotécnicas consisten en un conjunto de métodos de procesamiento de muestras para microscopía óptica y electrónica con la característica común de realizarse a bajas temperaturas (Steinbrecht y Zierold, 1987).

La técnica empleada en este trabajo fue la crioinclusión en Lowicryl K4M. Debido a su naturaleza hidrofílica, polimerización a bajas temperaturas y buena preservación ultraestructural, el Lowicryl se ha convertido en la resina más utilizada para experimentos inmunocitoquímicos y de hibridación in situ en una gran variedad de tipos celulares (Bendayan, 1984; Bendayan y col., 1987; Derenzini y col., 1990; Polak y Priestley, 1992; Puvion-Dutilleul, 1993; Quintana, 1994; Raska y col. 1992; Risueño y Testillano, 1994; Thiry y col., 1991). Esta resina es muy adecuada para estudios inmunocitoquímicos en relación a otras como LR white, que produce una extracción de componentes celulares (Griffiths, 1993). La optimización de las condiciones de procesamiento de material vegetal ha requerido alargar los tiempos de fijación e infiltración en resina, en relación a los descritos para tejidos animales

debido a la existencia de gruesas paredes celulares y vacuolas que dificultan la entrada de los reactivos (Testillano y col. 1991).

La fijación es una etapa clave en inmunocitoquímica que supone un compromiso entre la preservación de la estructura celular y el mantenimiento de la antigenicidad (Hayat, 1989; Vilaró, 1991). La utilización de formaldehído al 4% proporcionó una excelente preservación ultraestructural a la vez que el mantenimiento de las propiedades antigénicas de las muestras, por lo que se ha utilizado en todos los experimentos de inmunocitoquímica reflejados en esta Tesis. La densidad y tamaño de las estructuras celulares es superior a la observada en cortes de muestras procesadas convencionalmente, lo cual pone de manifiesto la baja extracción de componentes por los métodos de procesamiento a bajas temperaturas (Testillano y col., 1993b). Sin embargo la definición de la subestructura de diferentes compartimentos celulares, especialmente en el núcleo, no es siempre buena. En concreto la distinción entre los componentes fibrilares y granulares del nucleolo y de la región intercromatínica no es evidente en cortes de Lowicryl teñidos con uranilo y plomo, por lo que fue necesario desarrollar técnicas citoquímicas que mejorasen el contraste de las estructuras nucleares pero que no afectasen a la reactividad antigénica y química de las muestras (ver capítulo 2).

## **2. IMPORTANCIA DE LAS CITOQUÍMICAS ULTRAESTRUCTURALES EN LA DISTINCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS NUCLEARES EN ENSAYOS DE INMUNOMARCADO CON ORO**

Los estudios ultraestructurales para localizar proteínas implicadas en importantes funciones nucleares, ácidos nucleicos y determinadas secuencias de DNA y RNA ribosómico mediante inmunocitoquímicas, reacciones moleculares realizadas in situ (TdT) e hibridación in situ, se llevaron a cabo en cortes ultrafinos de muestras incluidas Lowicryl, resina que polimeriza a bajas temperaturas para preservar la reactividad antigénica y química. Los métodos de inmunomarcado con oro se combinaron con métodos citoquímicos que mejoran el reconocimiento de las diferentes estructuras nucleares en relación al contraste obtenido en cortes ultrafinos de Lowicryl teñidos con uranilo y plomo. Las técnicas de metilación-acetilación, MA, (Testillano y col., 1995b), preferencial para ácidos nucleicos y NAMA-Ur (Testillano y col., 1991), específica para DNA, fueron desarrolladas en nuestro laboratorio. También se utilizó la tinción de EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969) y digestión con DNasa en cortes de muestras tratadas con MA.

Ambas citoquímicas se emplearon para estudios sobre la organización funcional de la región intercromatínica y sus resultados serán discutidos en el apartado 4.2.2. de la discusión.

### **2.1. Citoquímica de metilación-acetilación (MA)**

El tratamiento de muestras con una mezcla de metanol y anhídrido acético produce la metilación y acetilación de los grupos carboxilo y amino libres de las proteínas (Tandler y Solari, 1982) impidiendo de este modo la unión del acetato de uranilo a los grupos reactivos de éstas. Por ello la tinción con uranilo y plomo de secciones ultrafinas después del tratamiento con MA proporciona resultados diferentes a los obtenidos tras tinción convencional de los cortes, mejorando el contraste de las estructuras que contienen ácidos nucleicos, tanto en células vegetales como animales (Testillano y col., 1995b). Además facilita la distinción entre los componentes fibrilares y granulares del nucleolo y de las diferentes estructuras de la región intercromatínica, lo cual hace que este método sea muy adecuado para estudios ultraestructurales de la función nuclear en varios sistemas celulares (Testillano y col., 1995b). Además, el hecho de que tras el tratamiento con MA las proteínas estén presentes hace que la preservación estructural sea muy buena.

Aunque los principales grupos de las proteínas que reaccionan con uranilo sean los carboxilo, los iones de uranilo también se unen a los grupos fosfato presentes en las proteínas (Lombardi y col., 1971; Stoekenius, 1961; Zobel y Beer, 1961, 1965). La reactividad de los grupos fosfato al uranilo no se bloquea por el tratamiento de metilación-acetilación por lo que en muestras tratadas con MA no se puede excluir el contraste de estructuras ricas en fosfoproteínas después de tinción con uranilo. Esto puede ser la causa del alto contraste mostrado por los grupos de gránulos peri e intercromatínicos en hepatocitos de ratón (Testillano y col., 1995b) en los que otros métodos citoquímicos, como la tinción de bismuto, han detectado la presencia de proteínas altamente fosforiladas tanto en animales como en plantas (Gas y col., 1984; Puvion-Dutilleul y Laithier, 1987; Testillano y col., 1993b).

El método MA se puede realizar en bloque, es decir, antes de la inclusión de las muestras, o en secciones ultrafinas de resinas o criocortes (Testillano y col., 1995b). Sin embargo el tratamiento en bloque es preferible a la tinción con MA sobre los cortes puesto que de este modo se evita la manipulación posterior de los mismos después de reacciones de inmunomarcado con oro a la vez que se obtiene un mejor

contraste. Además las secciones de muestras tratadas con MA se pueden teñir con la técnica regresiva de EDTA (Bernhard, 1969), preferencial para ribonucleoproteínas, o pueden ser digeridas con DNasa por lo que la combinación de ambos métodos resulta en un contraste preferencial de las estructuras que contienen RNA (Mena y col., 1994; Risueño y Testillano, 1994).

Cuando el método MA se aplica antes de la inclusión de las muestras en Lowicryl proporciona una buena preservación ultraestructural y visualización de los compartimentos nucleares. Este tratamiento nos ha permitido estudiar la estructura fina del nucleolo y región intercromatínica gracias a la discriminación entre estructuras fibrilares y granulares, así como el patrón de cromatina debido al alto contraste mostrado por las masas de cromatina condensada, que aparecen perfectamente delimitadas.

Una de las principales ventajas del método citoquímico MA es que no afecta significativamente la reactividad antigénica y química de las muestras (Testillano y col., 1995b). Este no es el caso de otros métodos citoquímicos, como la acetilación con piridina propuesta por Wassef (1979) que en ocasiones afecta la estructura fina de la célula (Testillano, 1991) y cuya incompatibilidad con métodos de detección inmunocitoquímica ha sido descrita (Thiry, 1992a). El hecho de que el tratamiento de MA no afecte las propiedades antigénicas y químicas de las muestras, ofrece la posibilidad de combinar la excelente visualización de las estructuras nucleares que proporciona con inmunomarcado con oro. Esta combinación se puede llevar a cabo sin añadir pasos adicionales al de por sí largo tratamiento de los cortes para técnicas inmunocitoquímicas, reacciones de biología molecular realizadas in situ (TdT, nick translation) e hibridación in situ.

Para probar el efecto del tratamiento con MA sobre el mantenimiento de la antigenicidad de las muestras, se utilizaron anticuerpos contra diferentes antígenos de localización nuclear (ácidos nucleicos y proteínas). En ningún caso ni el patrón ni la intensidad del marcado se afectaron significativamente tras el tratamiento de MA, obteniéndose resultados similares a los descritos anteriormente para algunos de estos anticuerpos en material no tratado con MA (Olmedilla y col., 1991, 1992; Testillano 1991; Testillano y col., 1992, 1993a,b, 1994).

La citoquímica MA se ha mostrado compatible con la inmunolocalización de DNA, RNA, híbridos DNA/RNA y proteínas (Testillano y col., 1995b). Sobre estas

últimas actúa el tratamiento de MA bloqueando sus grupos amino y carboxilo pero esto, sin embargo, no parece afectar a sus determinantes antigénicos. Se han localizado proteínas con diferentes propiedades químicas (asociadas a DNA, como histonas, PCNA o UBF, o asociadas a RNA, como la proteína D común a los snRNPs), diferente concentración o localización intranuclear (nucleolares, como fibrilarina o UBF, o extranucleolares, como histonas, PCNA o la proteína D de los snRNPs) revelando que esos tres factores no son afectados por el tratamiento de MA.

La localización ultraestructural de determinadas secuencias de RNA y DNA ribosómicos mediante hibridación in situ RNA/RNA y RNA/DNA, respectivamente, también ha sido posible en cortes de muestras tratadas con MA. Nuestros resultados indican que el tratamiento con metanol y anhídrido acético no afecta la reacción de hibridación. La posibilidad de combinar la hibridación in situ con esta técnica citoquímica ha sido decisiva, sobre todo en la localización de los genes ribosómicos potencialmente activos y sus transcritos en los distintos componentes nucleolares, cuyos límites están poco definidos en cortes de Lowicryl de muestras no tratadas con MA. De este modo hemos podido determinar una distinta distribución nucleolar del RNA ribosómico. Hemos visto que el marcado es superior en el componente granular del nucleolo que en el fibrilar denso, lo cual no había podido ser visualizado anteriormente utilizando cortes de Lowicryl de muestras no tratadas con MA (Olmedilla y col., 1993). Por otra parte la distribución nucleolar del RNA total obtenida utilizando anticuerpos anti-RNA en combinación con la citoquímica MA (Mena y col., 1994) muestra un intenso marcado sobre el componente granular y moderado sobre el CFD, lo que permite correlacionar la abundante presencia de las distintas especies de RNA con dos métodos diferentes y gracias a la utilización del tratamiento con MA.

La combinación del método citoquímico MA con localizaciones in situ para estudiar las regiones funcionales de la cromatina, tales como la reacción de TdT o el método de BrdU, ha proporcionado excelentes resultados. La intensidad y patrón de marcado son semejantes a los descritos anteriormente para estos métodos en muestras no tratadas con MA (Olmedilla y col., 1992; Risueño y Testillano, 1994).

En resumen, el procedimiento de metilación-acetilación es un método citoquímico simple y reproducible para contrastar estructuras que contienen ácidos nucleicos, cuya compatibilidad con técnicas de inmunomarcado con oro ha sido ampliamente probada en diferentes materiales y utilizando métodos diversos de

detección de moléculas como inmunocitoquímica, hibridación in situ y reacciones de biología molecular realizadas in situ. Permite una clara distinción de los componentes nucleares y por ello su combinación con inmunomarcado es muy útil puesto que facilita el reconocimiento de las estructuras en las que se localiza el marcado, lo cual no es siempre evidente en cortes de Lowicryl con tinción convencional. Por ello hemos propuesto el tratamiento de MA como una práctica de rutina muy útil no sólo para estudios de la organización funcional del núcleo si no también en estudios de otros compartimentos celulares en los que se haga necesario el uso del inmunomarcado con oro, tanto en células vegetales como animales (Testillano y col., 1995b).

## 2.2. Citoquímica NAMA-Ur

La técnica NAMA-Ur es una citoquímica específica para DNA, que se basa en una hidrólisis alcalina suave con hidróxido sódico que elimina el RNA y los grupos fosfato de las proteínas, seguido de un tratamiento de metilación-acetilación con una mezcla de metanol y anhídrido acético que, como ya se ha descrito anteriormente, bloquea de forma efectiva los grupos amino y carboxilo de las proteínas. La tinción con uranilo se debe a su afinidad por los grupos carboxilo, fosfato e hidroxilo en posición 3' por lo que, después del tratamiento, el uranilo sólo puede unirse al DNA (Testillano y col., 1991). Aunque las aplicaciones de esta técnica sólo se habían descrito a nivel ultraestructural hemos comprobado que, igualmente, el DNA se contrasta específicamente en cortes semifinos de muestras tratadas con NAMA-Ur observados en microscopía óptica bajo contraste de fase. Las imágenes del patrón de cromatina son semejantes a las observadas en cortes semifinos teñidos con DAPI, un fluorocromo descrito como un eficiente marcador de DNA (Vergne y col., 1987). La observación bajo contraste de fase de cortes semifinos de muestras tratadas con NAMA-Ur nos ha permitido seleccionar células en distintas fases del ciclo celular para estudios ultraestructurales del patrón de cromatina.

La técnica NAMA-Ur ha resultado ser muy específica para teñir DNA a nivel ultraestructural. Después del tratamiento y tinción de los cortes con uranilo las masas de cromatina condensada presentan un elevado contraste. Algunas de estas masas de cromatina condensada aparecen en estrecho contacto con el nucleolo, en ocasiones parcialmente incluidas en el cuerpo nucleolar. Éstas podrían representar la cromatina ribosómica inactiva a la vista de los resultados de hibridación in situ RNA/DNA en combinación con MA, que han permitido identificar secuencias

específicas de DNA ribosómico en ciertas masas de cromatina condensada localizadas en las proximidades del nucleolo (ver apartado 4.3. de la Discusión). En la *región intercromatinica se destacan fibras de cromatina dispersa, con un contraste más bajo que el que presentan las masas de cromatina condensada, formando una red en la región pericromatinica*. El nucleolo aparece claro a los electrones a excepción de las inclusiones de cromatina condensada de los centros fibrilares heterogéneos y ciertas áreas dispersas en el nucleolo cuyo contraste es semejante al de las fibras de cromatina dispersa localizadas en la región intercromatinica y que podrían ser la evidencia morfológica de los genes ribosómicos activos en transcripción. La combinación de la citoquímica NAMA-Ur con inmunomarcado con oro para detectar DNA, utilizando anticuerpos anti-DNA, mostró la distribución de las partículas de oro sobre las estructuras teñidas, lo cual confirma la especificidad de la técnica.

La citoquímica NAMA-Ur se llevó a cabo en bloque, es decir, antes de la inclusión de las muestras en Lowicryl y también en corte. Aunque la resolución fue mayor cuando se realizó en bloque, la combinación de la técnica con inmunodetección de histonas y DNA, para estudios del patrón de cromatina, proporcionó un marcado, si bien específico, de baja intensidad (datos no mostrados). Probablemente la hidrólisis alcalina previa a la inmunodetección afectó de alguna manera la estructura de los epitopos dificultando un reconocimiento efectivo de los antígenos, puesto que sabemos que el posterior tratamiento de metilación-acetilación *no afecta la reactividad antigénica de las muestras (ver apartado 2.1 de la Discusión)*. Por ello se optó por realizar la tinción con NAMA-Ur en corte después del inmunomarcado con anticuerpos anti-histonas y anti-DNA. En estos casos el marcado se localizó exclusivamente sobre las estructuras específicamente teñidas, siendo su intensidad semejante a la de los controles, teñidos con uranilo y plomo (Olmedilla y col., 1991).

La citoquímica NAMA-Ur se ha propuesto como un método de uso general para estudiar in situ los diferentes niveles de organización de la cromatina (Testillano y col., 1991). Su utilización por otros autores en otros sistemas celulares, pone de manifiesto la universalidad de la técnica (Derenzini y col., 1993). Además la posibilidad de combinarla con inmunolocalizaciones in situ permite relacionar la presencia de determinadas moléculas con el grado de compactación de la cromatina, lo cual proporciona una información muy útil para estudios sobre la organización funcional de la cromatina en diferentes estados de actividad. La tinción con amina de

osmio es otro método citoquímico ultraestructural para detectar DNA (Cogliati y Gautier, 1973), pero su combinación con técnicas de inmunomarcado con oro no es compatible (Risueño, comunicación personal).

### **2.3. Ventajas de la combinación de métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos**

La combinación de inmunomarcado con oro y citoquímicas es muy adecuada para determinar relaciones estructura-función puesto que las partículas de oro no penetran en las secciones de muestras incluídas en Lowicryl y sólo los determinantes antigénicos expuestos en la superficie de los cortes pueden ser revelados (Bendayan y col., 1987), mientras que las citoquímicas contrastan específica o preferencialmente determinadas estructuras en profundidad en todo el corte. En secciones transversales de cortes ultrafinos de Epon sobre los que se ha realizado la reacción de TdT, para localizar DNA, se ilustra perfectamente como las partículas de oro sólo detectan el DNA expuesto en la superficie del corte, mientras que la cromatina aparece contrastada en todo el espesor de la sección (Thiry, 1995b). Sólo algunos métodos citoquímicos se pueden combinar con inmunomarcado con oro. La aplicación de ambas técnicas sobre los mismos cortes proporciona una información muy útil para estudios funcionales al revelar la presencia de antígenos y las estructuras que los contienen (González-Melendi y col., 1995, 1996; Mena y col., 1994; Risueño y Testillano, 1994; Testillano y col., 1991, 1993a,b, 1995a,b).

Se asume que las partículas de oro identifican precisamente donde se localizan los antígenos. Sin embargo hay que tener en cuenta que los antígenos son generalmente revelados utilizando anticuerpos primarios y secundarios, estos últimos conjugados a partículas de oro, lo cual hace que el marcado pueda desviarse algunos nanómetros de la posición que ocupa el antígeno. Además los anticuerpos primarios pueden ser "extendidos" o "no extendidos" en función que de su mayor o menor desplazamiento respecto a la posición del antígeno que reconocen (Hozák, 1995). Esto puede ser conflictivo en la asignación del marcado en compartimentos adyacentes, aunque la definición de los límites entre ellos sea clara por la utilización de métodos citoquímicos. Por ello hemos empleado diferentes anticuerpos que localizan componentes de una misma estructura (DNA e histonas) o antígenos que revelan un mismo proceso (BrdU y PCNA) para disponer de más datos que nos permitan establecer con mayor seguridad relaciones estructura-función.

### 3. LOCALIZACIÓN DE LOS LUGARES DE REPLICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN FASE S

El estudio ultraestructural de las diferentes regiones funcionales de la cromatina en relación al proceso de replicación y la distribución intranuclear del DNA recientemente replicado se abordó mediante la utilización de técnicas de inmunolocalización de precursores marcados que se incorporan al DNA, como 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), y proteínas asociadas a los complejos de replicación, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Estos métodos se pusieron a punto en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L., un material muy utilizado para estudios de ciclo celular (De la Torre y col., 1989) y en el que nuestro grupo ha trabajado ampliamente en estudios de estructura-función (Risueño y Testillano, 1994).

El patrón de marcado después de incorporación in vivo de BrdU en células meristemáticas de raíces en proliferación y posterior inmunomarcado con oro, depende de la duración del pulso de BrdU. Después de pulsos cortos se encontraron células no marcadas y otras en cuyos núcleos el marcado fue positivo. En éstos las partículas de oro se localizaron en pequeños grupos sobre fibras de la región intercromatínica próximas a las masas de cromatina condensada, mientras que éstas estaban totalmente libres de marcado. Estos datos sugieren que la replicación del DNA tiene lugar en las fibras de cromatina dispersa de la región intercromatínica situadas en la periferia de la cromatina condensada. Este patrón de marcado ultraestructural coincide con el obtenido por autorradiografía tras incorporación de timidina tritiada (Testillano, 1991), si bien esta técnica requiere tiempos largos de exposición y la localización del marcado puede no ser tan precisa como la que proporcionan los métodos de inmunomarcado con oro ya que la localización ultraestructural de los granos de plata puede desviarse de la fuente de emisión de rayos  $\beta$ .

La incorporación in vivo tanto de timidina tritiada como de BrdU en microsporas y granos de polen es difícil debido a la barrera que supone la presencia de la exina. Por ello se desarrolló otro método que consiste en la detección de PCNA, una proteína de 36 Kd que ha sido identificada como auxiliar de la DNA polimerasa  $\delta$  cuya síntesis se estimula al final de G1 alcanzando valores máximos en fase S, después de la cual desciende a niveles basales, por lo que se ha propuesto que juega un papel esencial en la replicación del DNA en eucariotas (Bravo y col., 1987).

El gen que codifica esta proteína ha sido identificado en plantas (Suzuca y col., 1989) y su secuencia está muy conservada entre plantas y animales (Suzuca y col., 1991). Esta proteína ha sido detectada en células vegetales en proliferación mediante técnicas de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales (Citterio y col., 1992).

En cortes ultrafinos de meristemas radiculares de *Allium cepa* L. hemos obtenido un patrón de marcado con anticuerpos anti-PCNA muy semejante al descrito anteriormente respecto a la inmunolocalización de BrdU en el mismo material. Se encontraron células marcadas y no marcadas en función de la fase del ciclo celular en que se encontraban. En los núcleos marcados las partículas de oro se encontraron aisladas en la región intercromatínica, o bien formando pequeños grupos sobre algunas fibras de la región intercromatínica. Esta distribución ultraestructural de las partículas de oro que localizan PCNA se ha encontrado en lugares similares de la región intercromatínica en células animales y humanas (Raska y col., 1989; Sobczak-Thepot y col., 1993).

Existen dos poblaciones de PCNA durante el ciclo celular (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987). Una de ellas está presente a lo largo del ciclo celular en células fijadas con formaldehído pero que es extraída cuando las células se fijan con metanol o son permeabilizadas con detergentes como Triton X-100 antes de la fijación con formaldehído. Estos datos sugirieron una débil unión a estructuras nucleares o una presencia libre de esta población en el nucleoplasma. La otra no desaparece tras fijación con metanol o permeabilización con Triton X-100, lo cual parece indicar una fuerte interacción con determinadas estructuras nucleares y en ensayos de inmunofluorescencia en células fijadas con metanol da lugar a un patrón de marcado cuya distribución espacial y temporal es idéntica a la obtenida tras incorporación de timidina tritiada (Celis y Celis, 1985) y BrdU (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987). Estudios posteriores han confirmado la colocalización de PCNA y BrdU en ensayos de doble inmunomarcado, tanto a nivel de microscopía confocal (Humbert y col., 1992) como electrónica (Raska y col., 1991).

Nuestros datos apoyan la hipótesis de la existencia de dos poblaciones de PCNA, una de las cuales proporciona un marcado homogéneo en forma de partículas de oro aisladas en la región intercromatínica, que persiste debido a las condiciones de fijación utilizadas, mientras que la otra aparece asociada a lugares de replicación como parecen demostrar los resultados de experimentos de doble inmunolocalización

de PCNA y DNA, encontrándose partículas de oro de diferente tamaño, que localizan ambos antígenos, sobre fibras de cromatina descondensada en la periferia de las masas de cromatina condensada.

Los datos anteriormente expuestos nos han llevado a proponer el inmunomarcado con anticuerpos anti-PCNA como una alternativa a la técnica de incorporación in vivo y posterior inmunodetección de BrdU para su aplicación en procesos de desarrollo en plantas con una larga interfase como la de las microsporas, en los que la utilización de marcadores que se incorporan al DNA resulta difícil y poco adecuada, ya que no se conocen con exactitud los momentos en los que tiene lugar la replicación del DNA ni la duración de los mismos.

En microsporas y granos de polen de *Capsicum annuum* L. se observaron dos patrones de marcado con anticuerpos anti-PCNA al igual que en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. Se encontró un marcado de partículas de oro dispersas en la región intercromatínica en todas las fases de desarrollo analizadas que coexistía con otro representado por pequeñas agrupaciones de partículas de oro sobre fibras de cromatina descondensada, que reveló periodos de replicación del DNA.

En microsporas jóvenes, aún envueltas por la pared de calosa en la tetrada, se observó un marcado abundante, formado principalmente por agrupaciones de partículas de oro en la periferia de masas de cromatina condensada y fibras de la región intercromatínica, que sería correspondiente al inicio de la fase S y marcaría sitios de replicación. Posteriormente, en la fase de microspora vacuolada, se observó la localización ultraestructural de PCNA, indicando lugares de replicación, en las mismas estructuras nucleares, si bien la intensidad del marcado fue menor. Esta es una fase de larga duración durante la cual se aprecian cambios en la organización del núcleo a la vez que la progresión del proceso de vacuolación. Durante la misma se produce un periodo sostenido de síntesis de DNA revelado por la continuidad en el tiempo de un marcado con anticuerpos anti-PCNA en forma de partículas de oro agrupadas en diferentes periodos de la fase de microspora vacuolada. Este marcado decae en momentos próximos al final de la fase S para luego volver a aparecer asociado específicamente a las masas de cromatina adosadas a la envoltura nuclear, donde se encuentran las secuencias de replicación tardía (Comings y Okada, 1973; Hildebrand y Tobey, 1973).

La dinámica de la fase S en microsporas de *Capsicum annuum* L. estudiada mediante inmunomarcado ultraestructural con anticuerpos anti-PCNA, es semejante a la observada mediante un estudio citofotométrico de tinción con Feulgen en microsporas de *Scilla peruviana* L., una planta modelo para estudios secuenciales del desarrollo del grano de polen debido a la disposición de los botones florales en un gradiente de maduración (Testillano, 1991). Se detectaron dos periodos de replicación mayoritaria durante la fase S situados respectivamente al comienzo y final de la misma, en cada uno de los cuales se sintetiza aproximadamente la misma cantidad de DNA (Testillano, 1991). Sin embargo la cinética y duración de la síntesis es diferente en ambos casos. El primer periodo de replicación es más corto y el incremento en la carga de DNA es rápido. El segundo periodo de replicación es más largo y la pendiente que refleja el aumento en la cantidad de DNA es más suave. Estos datos podrían explicar la distinta intensidad de marcado agrupado con anticuerpos anti-PCNA, que localiza lugares de replicación, observado en microsporas jóvenes en fase de tetrada y microsporas vacuoladas tardías de *Capsicum*. El marcado es más abundante en microsporas jóvenes que en la fase vacuolada, indicando un periodo de intensa actividad replicativa en esos estadios tempranos. En la fase de microspora vacuolada se encontró un marcado menos intenso, pero específico, durante la misma, lo cual indica que la síntesis de DNA tiene lugar de forma más continuada en el tiempo y que esta fase es de larga duración.

Después de la división asimétrica de la microspora, se origina el grano de polen bicelular. En estadios tempranos, próximos a la mitosis, el patrón de marcado con anticuerpos anti-PCNA fue similar en las células generativa y vegetativa. Las partículas de oro se encontraron aisladas en la región intercromatínica. No se observó agrupación de partículas de oro en esta fase de polen bicelular joven. La evaluación cuantitativa del marcado en microsporas vacuoladas tardías y células vegetativa y generativa de polen bicelular joven puso de manifiesto una distinta distribución de las partículas de oro que refleja el distinto estado funcional de estos tres tipos celulares en relación a la síntesis de DNA (González-Melendi y col., 1996). El marcado aislado (1 o 2 partículas de oro) fue el más abundante en los tres casos, ligeramente superior en las microsporas vacuoladas que en el polen bicelular joven. Este marcado representa la presencia de una población de PCNA durante todo el ciclo y que incluso permanece después de finalizado el mismo en células diferenciadas (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987), como es la vegetativa. El mayor porcentaje de área de la región intercromatínica ocupado por este tipo de marcado aislado en microsporas vacuoladas (5.5%) en relación al que presentan las células

vegetativa y generativa del grano de polen bicelular joven (4% en ambos casos) está de acuerdo con el dato, también reflejado en el trabajo de Bravo y Macdonald-Bravo, de que la síntesis de PCNA se incrementa considerablemente durante la fase S. En relación al marcado agrupado (3 o más partículas de oro) se encontraron diferencias significativas entre las microsporas vacuoladas tardías y el polen bicelular joven (2% en microsporas vacuoladas frente a 0% y 0.18% en las células vegetativa y generativa, respectivamente). La comparación de los datos inmunocitoquímicos y cuantitativos sobre la localización y distribución del marcado con anti-PCNA entre microsporas vacuoladas y granos de polen bicelulares jóvenes nos permite afirmar que la fase de microspora vacuolada tardía se encuentra finalizando el periodo S del ciclo, mientras que no se detecta síntesis de DNA en etapas tempranas de la fase de polen bicelular joven.

En etapas posteriores del proceso de maduración del polen bicelular se encontró un patrón de marcado diferente con anticuerpos anti-PCNA en las células generativa y vegetativa, lo cual refleja el distinto destino de estas células. La célula generativa es la encargada de producir los gametos que participan en la doble fecundación de las angiospermas y en fases aún tempranas del polen bicelular comienza un periodo de síntesis de DNA. Las moléculas de PCNA se ensamblan en los complejos de replicación como se desprende de la aparición de un marcado en forma de pequeños grupos de partículas de oro, que no existía en células generativas de granos de polen bicelulares cercanos a la mitosis. En cambio la célula vegetativa prosigue su proceso de diferenciación y no entra en ciclo celular. El marcado con anticuerpos anti-PCNA en estas células es exclusivamente aislado.

En el citoplasma se observó ocasionalmente un marcado escaso, incluso en fases replicativas lo cual se puede interpretar como debido a un transporte rápido de PCNA hacia el núcleo en esas fases de síntesis en las que existe una gran demanda de estas moléculas en función del importante papel que juegan en la progresión de la replicación.

En células meristemáticas de *Allium cepa* L. después de 5 horas de incorporación de BrdU se ha detectado inmunomarcado con anticuerpos anti-BrdU en los componentes fibrilares del nucleolo en un periodo de la fase S en el que, a la vista del marcado generalizado observado sobre las masas de cromatina condensada, la mayor parte de la cromatina ya ha replicado (Reyes y col., 1994). La localización temporal del momento en que ocurre la síntesis de la cromatina nucleolar había sido

descrita anteriormente utilizando anticuerpos anti-PCNA y anti-BrdU en células de cáncer de mama humano MCF-7 (Humbert y col., 1992). En microsporas de *Capsicum annuum* L. se ha localizado marcado disperso con anticuerpos anti-PCNA en el componente fibrilar denso del nucleolo en la fase de tetrad que pensamos que no corresponde al periodo de replicación de la cromatina ribosómica, descrito al final de la fase S (Santisteban, 1993).

#### 4. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL NÚCLEO

El núcleo celular lleva a cabo numerosas y complejas funciones entre las que se incluyen el empaquetamiento del DNA, su replicación, transcripción, procesamiento de los pre-RNAs, transporte de las diferentes clases de RNA y proteínas y la precisa redistribución de los componentes nucleares durante mitosis. La extremadamente densa estructura nuclear está compartimentalizada para poder llevar a cabo eficazmente sus múltiples funciones. A nivel ultraestructural se pueden reconocer tres principales compartimentos nucleares: cromatina, región intercromatínica y nucleolo, cuya organización funcional cambia drásticamente según el estado de actividad de la célula.

Hemos abordado el estudio de la función nuclear mediante la aplicación de técnicas citoquímicas, inmunocitoquímicas y de hibridación in situ que nos han proporcionado información sobre la organización ultraestructural de las diferentes estructuras nucleares y las funciones que en ellas se llevan a cabo.

##### 4.1. Cromatina

La cromatina está formada por partes iguales en peso de DNA e histonas, así como de proporciones variables de otras proteínas de diferentes tipos, comúnmente llamadas no histonas, entre las que se encuentran varias DNA y RNA polimerasas así como proteínas reguladoras. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, que representa el primer nivel de organización para el empaquetamiento de las moléculas de DNA en los cromosomas (Igo-Kemenes y col., 1982; Kornberg y Klug, 1981; McGhee y Felsenfeld, 1980). Las proteínas de la cromatina responsables del empaquetamiento del DNA eucariótico en nucleosomas son las histonas. Son proteínas de pequeño tamaño que contienen una alta proporción de aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) y se unen estrechamente al DNA cargado negativamente. Existen cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4, que se

encuentran en cantidades equimoleculares, salvo H1 cuya abundancia es la mitad de las otras. El nucleosoma está formado por un octámero de histonas, que a su vez está constituido por un tetrámero (H3-H4)<sub>2</sub> flanqueado por dos dímeros H2A-H2B, en torno al cual se enrollan dos vueltas de DNA desnudo. Los nucleosomas consecutivos están separados por DNA conector, no asociado a histonas, cuya longitud es variable según las especies. La observación en microscopía electrónica del DNA organizado en nucleosomas muestra una fibra en rosario de 10 nm de espesor. La histona H1 es la responsable de su plegamiento en una fibra de 30 nm que a su vez experimenta sucesivos niveles de empaquetamiento hasta alcanzar el máximo grado de condensación en los cromosomas (revisión sobre la organización estructural de la cromatina en Santisteban, 1993).

Las histonas H3 y H4 son las más conservadas evolutivamente. En cambio las histonas H2A y H2B muestran una mayor variabilidad entre plantas y animales. En plantas se han caracterizado numerosas variantes y se han descrito pesos moleculares superiores a los determinados en animales (Spiker, 1982, 1985).

Recientemente se han identificado dos proteínas de 22.5 y 18.5 Kd, respectivamente, cuyas propiedades bioquímicas sugieren que se trata de variantes de las histonas H2B y H3 (Ueda y Tanaka, 1995). Estas histonas sólo han sido detectadas en células generativas de granos de polen de *Lolium longiflorum* L., por lo que han recibido los nombres de gH2B y gH3 (Ueda y Tanaka, 1995). Su exclusiva presencia en estas células, encargadas de producir los gametos, se ha relacionado con la aparición de variantes de histonas durante la espermatogénesis en animales. Aunque su función biológica no es clara, podrían estar implicadas en el elevado grado de condensación de la cromatina de los núcleos generativos, fácilmente detectada en microscopía de fluorescencia mediante tinción con DAPI, y por lo tanto con la escasa actividad transcripcional de estas células. La disponibilidad de anticuerpos contra las histonas gH2B y gH3 (Ueda y Tanaka, 1995) abre nuevas perspectivas en el estudio del desarrollo del gametofito masculino, no sólo como eficientes marcadores de la célula generativa, si no también para estudios sobre la organización funcional del núcleo en estas células.

Hemos estudiado la distribución ultraestructural de histonas en relación al patrón de cromatina. Para ello disponíamos de anticuerpos policlonales contra las histonas somáticas H2B y H4 (Muller y col., 1991). Los experimentos de *immunoblot* revelaron una distinta movilidad electroforética de las histonas H2B y H4 de *Allium*

*cepa* L. en geles de acrilamida en relación a la descrita en timo de ternera (Watson y col., 1987). Los pesos moleculares obtenidos en *Allium* son superiores a los establecidos para células animales, aunque en el caso de la histona H4 las diferencias no son muy acusadas. Sin embargo la variabilidad de la histona H2B es mayor. Su peso molecular es claramente superior al de la histona H2B de animales y se aproxima al rango de variación determinado en trigo (Spiker, 1982). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de variantes de histonas en plantas, cuyo tamaño es superior al de animales. Sin embargo los determinantes antigénicos de estas proteínas están muy conservados evolutivamente dado que los anticuerpos obtenidos contra histonas de animales reconocen a sus homólogas en plantas. Esto nos llevó a utilizar estos anticuerpos en experimentos de inmunocitoquímica en microscopía electrónica.

La inmunolocalización ultraestructural de las histonas H2B y H4 se llevó a cabo en combinación con las técnicas citoquímicas MA y NAMA-Ur con objeto de relacionar la distribución de histonas con el patrón de cromatina. Se obtuvo un patrón de marcado semejante con ambos anticuerpos. Se observaron abundantes partículas de oro sobre las masas de cromatina condensada, perfectamente contrastadas y delimitadas por los métodos citoquímicos utilizados, y en algunas fibras de la región intercromatinica, principalmente localizadas en la proximidades de la cromatina condensada, que representarían la cromatina dispersa. Se realizó una evaluación de la densidad de las partículas de oro que revelan las histonas H2B y H4, en distintos compartimentos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* L. tratadas con MA. La mayor densidad se encontró en las masas de cromatina condensada, del orden de seis veces superior a la densidad de partículas de oro en la región intercromatinica (González-Melendi y col., en preparación).

La proporción entre heterocromatina o cromatina condensada y eucromatina o cromatina descondensada es característica de cada tipo celular. Las técnicas citoquímicas revelaron que en *Allium cepa* las masas de cromatina son de gran tamaño, mientras que en *Capsicum annuum* el patrón de cromatina es más disperso, con pequeñas masas de cromatina condensada y abundantes fibras de cromatina descondensada en la región pericromatinica. Estas distintas organizaciones de la cromatina han sido definidas como tipo reticulado y cromomérico, respectivamente (Jordan y col., 1980; Lafontaine, 1968). La distribución del marcado utilizando anticuerpos anti-histonas obedeció a esta distinta organización de la cromatina en los dos materiales estudiados.

La localización inmunocitoquímica de DNA en combinación con las citoquímicas MA y NAMA-Ur ha permitido detectar de forma muy precisa y específica la presencia de DNA en el núcleo. El patrón de marcado fue semejante al proporcionado por los anticuerpos anti-histonas. Aunque la mayor parte de las partículas de oro se localizaron en las masas de cromatina condensada, también se detectaron granos de oro sobre fibras de la región intercromatínica, próximas a la cromatina condensada. La determinación de la densidad de partículas de oro sobre las masas de cromatina condensada y región intercromatínica en células meristemáticas de *Allium* tratadas con MA confirmó la distinta distribución del marcado en ambos compartimentos nucleares, siendo mayor sobre las masas de cromatina condensada (González-Melendi y col., en preparación).

La detección simultánea de histonas y DNA en cortes ultrafinos de muestras tratadas con MA ha mostrado la colocalización de ambos antígenos en las mismas estructuras nucleares. La intensidad del marcado fue inferior a la que se obtuvo cuando se realizó la inmunolocalización de histonas o DNA por separado, debido probablemente a impedimentos estéricos.

La realización de la reacción de TdT in situ y su posterior revelado utilizando anticuerpos conjugados con oro que localizan los nucleótidos marcados incorporados a los extremos hidroxilo 3' libres de DNA expuestos en la superficie de los cortes, constituye una alternativa más sensible a la técnica de inmunomarcado con anticuerpos anti-DNA, que incluso permite detectar muy pequeñas cantidades de DNA como el material genético de mitocondrias y plastidios (Thiry, 1992b). Mediante su aplicación sobre cortes ultrafinos de muestras tratadas con MA hemos determinado diferencias en el patrón de cromatina a lo largo del ciclo celular en *Allium* y durante el proceso de maduración del grano de polen de *Capsicum*. Esta técnica reveló en ambos materiales diferencias en el patrón de cromatina, como ya se ha mencionado, si bien fue más eficaz en la identificación de fibras de cromatina dispersa en la región intercromatínica que los métodos de inmunolocalización de DNA e histonas.

#### **4.2. Región intercromatínica**

La región intercromatínica es el espacio nuclear, comprendido entre las masas de cromatina condensada, excluido el nucleolo, en el que tiene lugar la replicación del DNA, la transcripción extranucleolar y el metabolismo del RNA heterogéneo. Estudios

anteriores realizados en nuestro laboratorio han caracterizado funcionalmente la región intercromatínica en el núcleo de células vegetales, principalmente su papel en la transcripción y *splicing* de los pre-mRNAs (Testillano y col., 1993a,b, 1994). En la presente Tesis se profundiza en ambos aspectos así como en la identificación de los lugares de replicación, relacionando la localización ultraestructural de estos procesos con la presencia de cromatina descondensada y estructuras ribonucleoproteicas en la región intercromatínica. Este estudio se llevó a cabo utilizando métodos citoquímicos y técnicas de inmunomarcado con oro, para localizar diferentes factores que participan en las funciones de replicación, transcripción y *splicing*.

El método de metilación-acetilación ha permitido definir la estructura fina de la región intercromatínica. En ella se distinguen gránulos y fibras de distinto tamaño. Hemos observado cambios en la densidad de las estructuras de la región intercromatínica en diferentes fases del ciclo celular en *Allium* y diferentes momentos del desarrollo del polen de *Capsicum*, que están relacionados con el grado de compactación de la cromatina. La descondensación de la cromatina representa momentos de intensa actividad en transcripción y replicación, cuya manifestación morfológica más evidente es un enriquecimiento de la región intercromatínica en fibras y gránulos (Bachelierie y col., 1975; Bouteille y col., 1974; Fakan y Puvion, 1980; Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1979; Testillano y Risueño, 1988).

La citoquímica MA revela en la región intercromatínica una densa red fibrilar, pero al tratarse éste de un método de tinción preferencial para ácidos nucleicos, no es posible determinar cuales de estas fibras contienen DNA o RNA. El estudio de la composición química de las estructuras de la región intercromatínica se llevó a cabo utilizando otras técnicas citoquímicas: la citoquímica NAMA-Ur, específica para DNA (Testillano y col., 1991) y la tinción de EDTA, un método preferencial para contrastar ribonucleoproteínas (RNPs) (Bernhard, 1969). La técnica NAMA-Ur identificó fibras de DNA en la región intercromatínica, preferentemente en las proximidades de las masas de cromatina condensada o área pericromatínica. Éstas corresponderían a fibras de cromatina dispersa presentes en la región intercromatínica. En fibras de esta región también hemos detectado DNA, mediante el uso de anticuerpos anti-DNA y el método de TdT, así como histonas. La tinción de EDTA reveló la existencia de una densa red fibrilo-granular entre áreas blanqueadas (Testillano y col., 1993a,b). Estas áreas blanqueadas por la tinción de EDTA se han descrito como masas de cromatina condensada, cuyo contraste prácticamente desaparece tras esta tinción (Bernhard, 1969; Puvion y col., 1984). Sin embargo hemos observado que esas áreas

presentan un tamaño mayor al de las masas de cromatina condensada específicamente teñidas con NAMA-Ur (Testillano y col, 1993b) o contrastadas tras tratamiento con MA en el mismo tipo de núcleos. Esto es muy evidente en microsporas de *Capsicum* cuyo patrón de cromatina, revelado por técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas, muestra pequeñas masas de cromatina condensada, mientras que en cortes ultrafinos teñidos con EDTA las áreas blanqueadas son considerablemente mayores (comparar las figuras 15a y 15b con las figuras 81 a 86, en las que se muestran imágenes de regiones nucleares de microsporas teñidas con EDTA y MA, respectivamente). La tinción de EDTA parece, pues, que elimina el contraste no sólo de las masas de cromatina condensada si no también del área pericromatínica adyacente donde preferentemente se localiza la cromatina dispersa. Este dato nos ha llevado a proponer una subcompartimentalización de la región intercromatínica en cuanto a su composición química que se manifiesta por una distinta localización preferente en la región intercromatínica, en relación a las masas de cromatina condensada, de dos tipos de fibras de diferente naturaleza química: fibras de cromatina descondensada, reveladas mediante tinción con NAMA-Ur, reacción de TdT in situ e inmunolocalización de DNA e histonas, en las que se localizarían los genes activos o preparados para transcripción y/o replicación y fibras de ribonucleoproteínas reveladas por EDTA que representarían diferentes etapas de la transcripción y procesamiento del RNA heterogéneo nuclear. Estos datos sugieren la existencia de una subcompartimentalización estructural y funcional de la región intercromatínica en función de su proximidad a las masas de cromatina condensada.

#### 4.2.1. Fibras de cromatina descondensada

La organización estructural de los genes activos debe ser distinta a la de la cromatina inactiva para permitir el acceso de las maquinarias de transcripción y replicación. Los dominios activos de la cromatina pueden ser funcionalmente definidos en base a su susceptibilidad a ser digeridos con endonucleasas. Weintraub y Groudine (1976) observaron que el gen de la globina es digerido por DNasa I pancreática en núcleos de eritrocitos de pollo pero no en fibroblastos. Levitt y col. (1979) aprovecharon este descubrimiento para marcar secuencias sensibles a digestión por nucleasa en núcleos aislados. Su procedimiento se basaba en la reacción de *nick translation*, un método frecuentemente utilizado para marcar DNA purificado (Rigby y col. 1977). La técnica de *nick translation* desarrollada por Levitt y col. consiste en una digestión con DNasa I, que produce cortes en una de las hebras

del DNA expuesto. La adición de DNA polimerasa I resulta en una degradación del DNA en la posición 3' de las zonas de corte, debido a su acción exonucleasa, que es reemplazado por una nueva cadena de DNA en la que se incorporan nucleótidos marcados (Levitt y col., 1979). La adaptación para microscopía electrónica de la técnica de *nick translation* (Thiry, 1991) ha permitido investigar la localización específica de los genes activos o potencialmente activos, debido a la sensibilidad de éstos a la DNasa I. La optimización de esta técnica para criocortes se realizó en nuestro laboratorio (Olmedilla y col., 1992). Los resultados dependen de la concentración de DNasa I. A bajas concentraciones, 30 µg/ml, el marcado se localizó en el área pericromatínica (Olmedilla y col., 1992; Thiry, 1991). La localización de la cromatina activa mediante la técnica de *nick translation* coincide con nuestros resultados de detección ultraestructural de DNA mediante técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas en fibras de la región intercromatínica, próximas a la masas de cromatina condensada. Por consiguiente podemos considerar que las fibras de cromatina descondensada localizadas en el área pericromatínica corresponden a estados de la cromatina activos o preparados para transcripción o replicación.

La inmunolocalización de histonas en fibras de la región intercromatínica abre la discusión sobre si las fibras de cromatina descondensada están organizadas en nucleosomas o si la asociación de histonas y DNA se modifica de alguna forma para permitir el acceso de las maquinarias de transcripción y replicación. Los datos inmunocitoquímicos evidencian la presencia de histonas en estas fibras. Datos bioquímicos de otros autores sugieren que los genes activos o potencialmente activos están empaquetados en una forma nucleosomal alterada que les hace accesibles a las maquinarias de transcripción y replicación, en función de su sensibilidad a la DNasa I pero no a la nucleasa micrococcal (revisión en Reeves, 1984 y Weisbrod, 1982). Recientemente Truss y col. (1995) han descrito que la inducción por hormonas esteroideas de la expresión del promotor del MMTV (*Mouse mammary tumour virus*) supone una reorganización del nucleosoma en que está contenida la región promotora, para permitir la unión al DNA de los elementos reguladores y factores de transcripción, pero en ningún caso, una eliminación de histonas. El cambio en la organización estructural del nucleosoma producido por la inducción hormonal podría estar mediado por acetilación de histonas, cuya relación con la actividad transcripcional ha sido descrita (Hebbes y col., 1988).

La localización de los lugares de transcripción extranucleolar y de replicación mediante técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas ha aportado una valiosa

información acerca de la organización funcional del núcleo y en concreto sobre la subcompartimentalización funcional de la región intercromatínica.

Recientemente se ha puesto a punto un método para localizar lugares de transcripción que consiste en pulsos cortos de incorporación de Br-UTP en células en cultivo para marcar RNA naciente (Dundr y Raska, 1993; Jackson y col., 1993; Raska, 1995; Raska y col., 1995; Wansink y col., 1993). A nivel de microscopía óptica se han localizado pequeñas regiones fluorescentes distribuidas en el espacio intercromatínico. A nivel ultraestructural el marcado se localiza en la periferia de la cromatina condensada (Raska, 1995). Estos resultados coinciden con datos de otros autores que mediante autorradiografía ultraestructural, para localizar la incorporación temprana de uridina tritiada (Fakan y Puvion, 1980; Fakan y col., 1976) han identificado los lugares de transcripción en el área pericromatínica. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método sencillo y reproducible para la localización ultraestructural de los lugares de transcripción que se basa en la detección de híbridos DNA/RNA (Testillano y col., 1994) mediante la utilización de anticuerpos específicos (Kitagawa y Stollar, 1982). En esta Tesis se muestran por primera vez resultados de la combinación de este método con la citoquímica MA que supuso una notable mejora en el reconocimiento e identificación de las estructuras marcadas. Las partículas de oro se localizaron en fibras de cromatina dispersa distribuidas en la región intercromatínica, preferentemente en el área pericromatínica. Los datos obtenidos de la aplicación de diferentes técnicas apuntan pues a que la región pericromatínica es el subcompartimento nuclear en el que tiene lugar la transcripción extranucleolar.

El área pericromatínica es el subdominio de la región intercromatínica en que se produce la replicación del DNA. El estudio ultraestructural de la distribución del DNA en replicación se abordó mediante inmunodetección de precursores marcados que se incorporan al DNA (BrdU) y proteínas asociadas a los complejos de replicación (PCNA). En ambos casos el marcado se localizó en fibras de cromatina descondensada en la periferia de la cromatina condensada. La asociación de PCNA y DNA durante el proceso de replicación se demostró en experimentos de doble marcado para localizar simultáneamente ambos antígenos, observándose colocalización de partículas de oro de diferente tamaño en las mismas estructuras en las que se observó marcado en grupos de partículas, con anticuerpos anti-PCNA, que revela lugares de replicación, en experimentos de inmunodetección simple.

Las fibras de cromatina descondensada, localizadas mediante técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas en el área pericromatínica, son pues activas o están preparadas para transcripción y/o replicación. Nuestros datos parecen confirmar los resultados de Hassan y col. (1993) en el sentido de que los lugares de transcripción y replicación colocalizan en los mismos dominios nucleares.

#### 4.2.2. Fibras de ribonucleoproteínas

Las fibras de ribonucleoproteína (RNP) son la expresión morfológica de la transcripción extranucleolar. Su abundancia está directamente relacionada con el estado de actividad de la célula y son numerosas en núcleos activos en transcripción (Fakan y Puvion, 1980; Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1979; Testillano y Risueño, 1988). Las fibras de RNP fueron identificadas y reveladas por el método citoquímico ultraestructural de EDTA descrito por Bernhard (1969), quien las definió como fibras pericromatínicas en función de su localización en la periferia de las áreas blanqueadas por la tinción, en las que se asumía que se localizaba la cromatina (Bernhard, 1969; Puvion y col., 1984). Nuestros resultados demuestran que esas áreas blanqueadas por EDTA tienen un tamaño superior al de las masas de cromatina condensada específicamente teñidas por NAMA-Ur, por lo que la tinción de EDTA desplaza los iones uranilo no sólo de la cromatina condensada si no también de la dispersa, localizada en el área pericromatínica, y revela un subcompartimento de la región intercromatínica enriquecido en RNPs situado hacia el interior nuclear. En base a esta estructuración de la región intercromatínica, una denominación más correcta para las fibras pericromatínicas descritas por Bernhard, sería las de fibras intercromatínicas. El término de fibras pericromatínicas se restringiría a las fibras de cromatina descondensada situadas en el área pericromatínica.

Existen pues dos subcompartimentos en la región intercromatínica de distinta naturaleza química y distinta posición relativa respecto a las masas de cromatina condensada. Los límites entre ambos no están claramente definidos y de hecho, los datos disponibles apuntan a la existencia de un solapamiento de los dominios peri e intercromatínico en el que fibras de DNA y RNP colocalizan. La aplicación de la tinción de EDTA después de inmunolocalización de DNA utilizando anticuerpos anti-DNA, muestra las partículas de oro sobre fibras de RNP localizadas en el borde de las áreas blanqueadas (Testillano 1991; Testillano y col. 1993b). La colocalización de fibras de DNA y RNP representa la unión del DNA molde y el RNA heterogéneo recién sintetizado y revela un dominio funcional en el borde de los dos

subcompartimentos de la región intercromatínica, en donde tendría lugar la transcripción extranucleolar. Las fibras de RNP formadas en los lugares de transcripción, migran hacia el interior del espacio intercromatínico a medida que la síntesis de RNA progresa (Puvion y Moyne, 1978). Datos posteriores han mostrado que las fibras intercromatínicas aparecen asociadas con *small nuclear ribonucleoprotein particles* (snRNPs) (Fakan y col., 1984; Puvion y col., 1984; Testillano y col., 1993a,b; Visa y col., 1993). Los snRNPs están formados por proteínas y snRNAs (Lührmann, 1988). Los snRNAs juegan un papel fundamental en la reacción de *splicing* o eliminación de intrones que tiene lugar después de la transcripción extranucleolar (Guthrie y Patterson, 1988; Lührmann y col., 1990; Maniatis y Reed, 1987; Mattaj, 1990). Hemos abordado la localización de los snRNPs mediante la utilización del anticuerpo 7.13 que reconoce la proteína D común a los snRNPs extranucleolares U1, U2, U4/U6 y U5. La combinación del inmunomarcado con oro con citoquímicas permitió identificar y caracterizar las estructuras marcadas y aportó datos sobre la organización funcional de la región intercromatínica. En cortes de muestras tratadas con MA, las partículas de oro se localizaron dispersas sobre fibras de la región intercromatínica y no sobre gránulos. La aplicación de la tinción de EDTA sobre cortes incubados con el anticuerpo 7.13 demostró que el marcado se detectaba sobre fibras de RNP. Estas fibras son pues el principal sustrato del *splicing*. En la actualidad no existe un consenso sobre si el *splicing* ocurre co o postranscripcionalmente. Según los resultados de Wansink y col., (1993) la distribución del marcado con anticuerpos que reconocen SC-35, un factor esencial de *splicing* que no pertenece a la clase de los snRNPs, no coincide con la localización de los lugares de transcripción. En cambio Jiménez-García y Spector (1993) han descrito un reclutamiento de factores de *splicing* hacia los sitios de transcripción en respuesta a infección por adenovirus 2, lo cual apoya la idea de un procesamiento cotranscripcional del pre-mRNA. Una aproximación al tema consiste en comparar la distribución del marcado anti-snRNPs y anti-RNA en la región intercromatínica. Hemos determinado la presencia de RNA en la región intercromatínica mediante inmunolocalización con anticuerpos anti-RNA en cortes teñidos con EDTA y sobre cortes de muestras tratadas con MA y digeridos con DNasa. Las imágenes obtenidas fueron muy semejantes y en ambos casos se contrastaron las estructuras que contienen RNPs. La distribución del marcado con oro que localiza el RNA total fue similar que la que obtuvimos con anticuerpos anti-snRNPs, aunque de menor intensidad, probablemente debido a un enmascaramiento del RNA. Nuestros datos de la localización de RNA y snRNPs nos permiten sugerir que el proceso de *splicing* se inicia cotranscripcionalmente, puesto que en ambos casos hemos localizado

marcado sobre fibras de RNP situadas en el borde de las áreas blanqueadas por EDTA, que como hemos mencionado anteriormente, representaría la zona de solapamiento entre los dos dominios de la región intercromatínica, activa en la transcripción extranucleolar. Posteriormente el marcado anti-RNA y anti-snRNPs se desplaza hacia fibras de RNP más alejadas de las masas de cromatina condensada, por lo que el proceso de *splicing* continúa una vez finalizada la transcripción.

En núcleos de células de mamífero se ha localizado marcado anti-snRNPs en gránulos intercromatínicos (ver revisión en Thiry, 1995a). Éstos aparecen agrupados en el interior de la región intercromatínica, formando estructuras muy prominentes. La ausencia en ellos de DNA, así como de marcado después de pulsos cortos de incorporación de uridina tritiada indica que no están implicados en la síntesis de mRNAs, si no que desempeñan, posiblemente, una función de almacenamiento o reensamblaje de los elementos que participan en los procesos de poliadenilación y *splicing* (ver revisión en Thiry, 1995a). En células vegetales no se han descrito estructuras homólogas a los gránulos intercromatínicos, si no enclaves de naturaleza fibrilar que se marcan con anticuerpos anti-snRNPs (Testillano y col., 1993b). Sin embargo Beven y col. (1995) en base a que la distribución del marcado fluorescente anti-snRNPs en células meristemáticas de *Pisum* es semejante al patrón de marcado obtenido en células animales, no descartan la existencia de gránulos intercromatínicos en plantas, aunque no existen evidencias ultraestructurales que correlacionen el marcado anti-snRNPs con los gránulos identificados en la región intercromatínica de núcleos de células vegetales (Testillano y col., 1993a, b).

En base a los resultados presentados hemos propuesto un modelo de la organización funcional de la región intercromatínica, que se ilustra en el siguiente esquema (Fig. 1). Ésta estaría estructurada en dos subcompartimentos, química y funcionalmente distintos: el área pericromatínica, enriquecida en fibras de cromatina descondensada, y el área intercromatínica, propiamente dicha, enriquecida en RNPs. La cromatina tiene que descondensarse para ser activa en transcripción y replicación. Las fibras de DNA localizadas en el área pericromatínica se encontrarían en diferentes estados de descondensación para permitir la unión de las enzimas y factores que participan en las funciones de transcripción y replicación. La transcripción extranucleolar ocurriría en una zona en la que ambos dominios se solapan, donde las fibras de DNA y RNP colocalizan, y el proceso de *splicing* se iniciaría cotranscripcionalmente y se completaría a posteriori en el interior de la región intercromatínica. Los datos mostrados apuntan a que, de forma semejante a lo que

ocurre en el nucleolo (ver siguiente apartado), la organización de la región intercromatínica sigue un orden vectorial. Para apoyar esta hipótesis es necesario aplicar los métodos de localización in situ de moléculas y procesos, empleados en esta Tesis, para estudiar en profundidad la dinámica de la región intercromatínica en otros momentos de actividad y otros sistemas celulares.

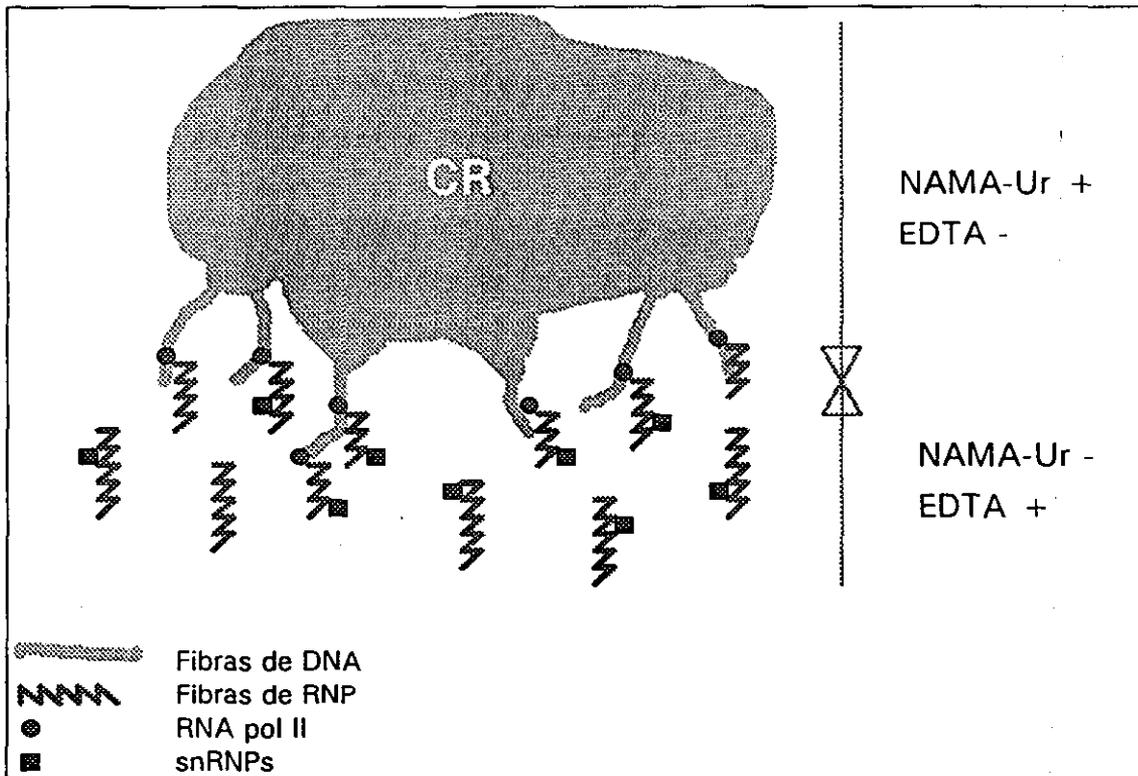


Figura I: Interpretación de la organización funcional de la región intercromatínica

#### 4.3. Nucleolo

El nucleolo es el compartimento nuclear en el que tiene lugar la transcripción del RNA ribosómico, su procesamiento y ensamblaje en las partículas prerribosómicas (Goessens, 1984; Hadjiolov, 1985; Hernández-Verdun, 1991; Scheer y Benavente, 1990). El nucleolo representa la expresión morfológica de la actividad de los genes ribosómicos y experimenta grandes cambios en la disposición y organización de sus componentes en relación a la tasa de síntesis de ribosomas (Risueño y Medina, 1986; Risueño y Testillano, 1994) por lo que es un buen marcador del estado de actividad celular.

#### 4.3.1. Arquitectura nucleolar

Hemos seguido los cambios en la organización ultraestructural del nucleolo en distintas fases del ciclo celular de *Allium cepa* y durante el desarrollo del polen de *Capsicum annuum*, mediante el tratamiento de las muestras con MA. Este método citoquímico, al facilitar la distinción entre estructuras granulares y fibrilares, permite una definición clara de los límites de los distintos componentes del nucleolo, lo cual no siempre es fácil en cortes de muestras incluidas en Lowicryl. A nivel ultraestructural se reconocen las siguientes regiones nucleolares: centros fibrilares (CFs), componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG) y vacuolas nucleolares (Derenzini y col., 1990; Goessens, 1984; Hernández-Verdun, 1986; Jordan, 1984, Scheer y Benavente, 1990; Yasuzumi y Sugihara, 1965). El CFD se compone de fibras ribonucleoproteicas estrechamente empaquetadas. Su volumen es muy superior en plantas, en comparación con el CFD de células animales que está reducido a una fina capa asociada a los CFs. Los CFs son pequeñas áreas claras a los electrones incluidas en el CFD, que contienen material fibrilar en su interior. En plantas se han descrito dos tipos de CFs en relación a la actividad transcripcional: los CFs homogéneos, pequeños y numerosos, que contienen cromatina dispersa y los CFs heterogéneos, de mayor tamaño y menos numerosos que los homogéneos, que contienen inclusiones de cromatina condensada junto con fibras de cromatina descondensada. Existe un tipo intermedio de CFs que comparte características estructurales de los CFs homogéneos y heterogéneos (Medina y col., 1983; Risueño y Medina, 1986). Las vacuolas nucleolares son también áreas de baja densidad electrónica y son de dos tipos: reactivación y actividad. Las primeras aparecen en conexión con los CFs y se observan en procesos de reactivación nucleolar, como en las fases G1 y comienzo de S del ciclo celular. Las vacuolas de actividad están asociadas al componente granular y contienen gránulos de RNP. Aparecen en nucleolos activos, generalmente al final de la fase S y en G2. El componente granular está formado por las partículas prerribosómicas. Su abundancia y disposición en el nucleolo está relacionada con la actividad nucleolar.

El nucleolo sufre cambios dinámicos en relación a la actividad transcripcional (Risueño y Testillano, 1994). En nucleolos activos el CG es abundante y se encuentra disperso entre el CFD; los CFs homogéneos son numerosos y se observan vacuolas de actividad. En nucleolos muy activos, con frecuencia se observa una única gran vacuola de actividad. En cambio los nucleolos poco activos están formados casi exclusivamente por CFD en cuyo interior se observan grandes CF heterogéneos,

producidos por la entrada de la región organizadora del nucleolo (NOR) que contiene los genes ribosómicos. Cuando el nucleolo se activa, aparecen las vacuolas de reactivación que están conectadas con CFs de tipo intermedio. Una rápida disminución de la actividad transcripcional produce una morfología segregada que en nucleolos de plantas se manifiesta por la disposición del CG alrededor de CFD.

#### 4.3.2. Localización de la cromatina ribosómica

Hemos abordado la identificación de los procesos bioquímicos que ocurren en los distintos componentes nucleolares, anteriormente descritos, mediante técnicas de detección in situ de moléculas cuya distribución nos ha aportado datos que nos han permitido establecer relaciones entre la subcompartimentalización estructural del nucleolo y las funciones que se llevan a cabo en los distintos componentes nucleolares. La localización ultraestructural de DNA en el nucleolo es clave para comprender la organización funcional de este compartimento nuclear en relación al proceso de transcripción. Para ello se aplicaron diferentes técnicas: hibridación in situ, utilizando sondas ribosómicas, citoquímicas (NAMA-Ur), inmunocitoquímicas (anti-DNA) y reacciones de biología molecular realizadas in situ (TdT).

La localización de secuencias de DNA ribosómico mediante la técnica de hibridación in situ ha aportado información precisa sobre la organización funcional de la cromatina ribosómica y su distribución en el nucleolo en relación a la actividad transcripcional. A nivel de microscopía confocal una distinta intensidad de la señal fluorescente se reparte diferencialmente en el nucleolo. El tratamiento de las imágenes para transformar la escala de grises, que refleja la intensidad de la señal de fluorescencia, en una escala de color, nos permitió asignar distintos colores a los distintos estados de condensación de la cromatina ribosómica y, de este modo, determinar con mayor precisión el grado de empaquetamiento de la cromatina ribosómica en relación a su posición en el nucleolo y en diferentes estados de actividad nucleolar. Las masas de intensidad de fluorescencia alta (color rojo), en un número máximo de cuatro y aspecto redondeado, en conexión con el nucleolo, representarían la cromatina ribosómica inactiva, puesto que la transcripción no puede llevarse a cabo en estados de tan alta compactación. La red fibrilar de baja intensidad de fluorescencia (color azul) en el interior nucleolar, indicaría un estado descondensado del DNA ribosómico. Esta red fibrilar es más abundante en nucleolos activos por lo que interpretamos que representa la cromatina activa o preparada para transcripción. Incluidos en la red fibrilar, se identificaron pequeñas regiones

fluorescentes con una intensidad de marcado intermedia (color verde) o alta (color rojo), en nucleolos activos o poco activos, respectivamente. Estas regiones fluorescentes podrían corresponder a los dos tipos de CFs descritos en plantas: homogéneos, de intensidad de fluorescencia intermedia, y heterogéneos, que muestran una señal intensa. El diferente estado de condensación del DNA ribosómico en nucleolos con distinta actividad transcripcional, sugiere una regulación de la expresión de los genes ribosómicos por condensación-descondensación de la cromatina (Highett y col., 1993). A nivel ultraestructural los datos en nucleolos inactivos de células meristemáticas durmientes de raíces no brotadas y nucleolos activos de células meristemáticas en proliferación fueron diferentes. En el primer caso, el marcado fue escaso y se localizó en el CFD, que es el componente mayoritario en este tipo de nucleolos. El DNA ribosómico también se localizó en masas de cromatina condensada que penetran en el nucleolo, formando un gran CF heterogéneo en su interior. En nucleolos activos, la señal de hibridación fue más elevada y se localizó principalmente en el CFD.

Las microscopías confocal y electrónica nos han aportado una información complementaria. La primera nos ha permitido determinar diferentes estados de organización de la cromatina ribosómica en base a la distinta intensidad de fluorescencia obtenida, que es función del grado de compactación de la cromatina. En cambio la microscopía electrónica ha mostrado la distribución ultraestructural del DNA en el nucleolo y la utilización de la citoquímica MA ha facilitado la asignación del marcado a componentes específicos del mismo. La correlación entre la organización estructural de la cromatina ribosómica y la identificación inequívoca de su posición en el nucleolo vendrá de la aplicación de las técnicas de microscopía correlativa que permiten observar el marcado sobre las mismas células en microscopía óptica y electrónica mediante la utilización de métodos de revelado compatibles con ambas microscopías (Deerinck y col., 1994) o el empleo de microscopios electrónicos de barrido de alta resolución, que permiten la observación directa de estructuras macromoleculares (Shaw, comunicación personal).

La técnica NAMA-Ur mostró el nucleolo como un área clara a los electrones, con algunas inclusiones de cromatina condensada, correspondientes a los CFs heterogéneos. Asimismo se identificaron algunas fibras en el interior del cuerpo nucleolar, aunque menos intensamente teñidas que las inclusiones de cromatina de los CFs heterogéneos, que por su posición podrían estar distribuidas en el CFD. Las masas de cromatina condensada en estrecha relación con el nucleolo, que incluso

penetran en su interior, podrían representar la cromatina ribosómica inactiva. La aplicación de esta técnica sobre cortes incubados con anticuerpos anti-DNA mostró las partículas de oro sobre las estructuras específicamente teñidas. La citoquímica NAMA-Ur revela, pues, de forma específica la presencia de DNA en el nucleolo, aunque no permite relacionarla con la subcompartimentalización estructural del mismo. Por ello se complementó con el inmunomarcado anti-DNA en cortes de muestras tratadas con MA para determinar la distribución de DNA en los distintos componentes del nucleolo, perfectamente identificados en estas secciones. Las partículas de oro se localizaron en ambos tipos de CFs, homogéneos y heterogéneos, así como en determinadas regiones del CFD, preferentemente situadas en la proximidad de los CFs. La evaluación de la densidad de partículas de oro en estos componentes mostró que los valores más altos se encontraban en los CFs heterogéneos, debido a la presencia de inclusiones de cromatina condensada. Los CFs homogéneos presentaron valores intermedios y los valores más bajos se encontraron en el CFD, debido a su gran tamaño en plantas y a la distribución irregular del marcado en este componente nucleolar (González-Melendi y col., en preparación). También utilizamos otras técnicas ultraestructurales para localizar DNA. La realización in situ de la reacción de TdT, constituye una alternativa muy sensible para localizar pequeñas cantidades de DNA en cortes ultrafinos (Testillano y col., 1995a; Thiry, 1992b). Nosotros la hemos combinado con la citoquímica MA y hemos encontrado marcado en los CFs y regiones del CFD, próximas a aquellos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos tras la detección de secuencias de DNA sensibles a DNasa I mediante la técnica de *nick translation* sobre criocortes (Olmedilla y col., 1992). Para la localización de la cromatina nucleolar se requieren concentraciones de DNasa I de 300  $\mu\text{g/ml}$ , superiores a las empleadas para detectar la cromatina extranucleolar activa. Las partículas de oro se encontraron sobre los CFs y en el CFD, donde se distribuyeron de forma irregular, preferentemente cerca de los CFs. Anteriormente, Thompson y Flavell (1988) habían determinado mediante datos bioquímicos que los genes ribosómicos activos están organizados en una conformación que les hace más sensibles a la DNasa I.

En resumen, la observación de los resultados de hibridación in situ RNA/DNA en microscopía confocal y el posterior tratamiento de las imágenes ha permitido definir diferentes niveles de organización del DNA ribosómico. La realización de hibridación in situ en microscopía electrónica, así como técnicas para la localización ultraestructural de DNA (citoquímicas, inmunocitoquímicas y reacciones moleculares

realizadas *in situ*) han detectado la cromatina nucleolar en los CFs y ciertas regiones del CFD, en ocasiones próximas a los CFs.

El estudio ultraestructural de la distribución de histonas en el nucleolo utilizando anticuerpos anti-histonas H2B y H4, ha mostrado la presencia de partículas de oro en los mismos componentes en los que hemos detectado DNA, es decir, CFs y CFD. La evaluación de la densidad de partículas de oro en esos componentes *determinó valores descendentes desde los CFs heterogéneos al CFD, con valores intermedios en los CFs homogéneos* (González-Melendi y col., en preparación). Otros autores también han demostrado una distribución coincidente de DNA e histonas en el nucleolo, bien en los CFs y CFD (Raska y col., 1995) o exclusivamente en los CFs (Thiry y Muller, 1989). En cambio Derenzini y col. (1985) afirman que la cromatina ribosómica en linfocitos humanos está libre de histonas. Nuestros datos indican la presencia de histonas en los componentes fibrilares del nucleolo pero no nos permiten determinar si existe o no una configuración nucleosomal de la cromatina ribosómica en el interior del nucleolo. Conconi y col. (1989, 1992) han demostrado la existencia de dos poblaciones de DNA ribosómico, una que contiene nucleosomas y representa los genes inactivos, y otra que carece de una organización nucleosomal y corresponde a los genes activos o preparados para transcripción. Estos autores han determinado que en tomate un 80% de la cromatina ribosómica se encuentra en estado nucleosomal, mientras que el 20% restante se encuentra en una forma "abierta" (Conconi y col., 1992). Sus estudios se basan en la utilización de psoraleno, una sustancia empleada para el diagnóstico de la cromatina activa e inactiva en función del establecimiento o no de uniones entre las dos hebras de DNA y la observación en microscopía electrónica de la organización de los extendidos de DNA ribosómico en condiciones desnaturalizantes (Sogo y col., 1984). La ausencia de una conformación nucleosomal no excluye, que de la misma forma que ocurre en otros genes (Truss y col., 1995), las histonas permanezcan unidas al DNA ribosómico descondensado de otra forma. Por ello consideramos que la distribución coincidente de histonas y DNA en los mismos componentes nucleolares no descarta que el DNA localizado en los componentes fibrilares del nucleolo se encuentre en una configuración activa en transcripción. Otra posible interpretación es que la presencia de histonas en el nucleolo esté relacionada con la regulación de la expresión de los genes ribosómicos, de forma que estarían próximas al DNA para empaquetarlo en niveles de organización superiores cuando la actividad transcripcional decae.

#### 4.3.3. Localización de los lugares de transcripción y procesamiento

La identificación de los componentes nucleolares en los que se llevan a cabo las funciones de transcripción y procesamiento del RNA ribosómico y su reorganización en diferentes estados de actividad transcripcional, requiere el estudio de la distribución de otras macromoléculas en relación a la localización de DNA.

Para determinar el estado funcional de la cromatina nucleolar fue preciso utilizar anticuerpos que detectan antígenos que revelan el proceso de transcripción, y comparar su patrón de marcado con la distribución de DNA en el nucleolo. Hemos estudiado la distribución de los lugares de transcripción ribosómica utilizando anticuerpos anti-híbridos DNA/RNA, que detectan la unión del DNA molde y el RNA transcrito. El marcado se localizó en el CFD aunque no homogéneamente repartido. Las partículas de oro suelen aparecer en las proximidades de los CFs, pero no en el interior de éstos. Este patrón de marcado, previamente descrito por Testillano y col. (1994), fue confirmado por la aplicación de este método sobre cortes ultrafinos de muestras tratadas con la citoquímica MA, que permitió un mejor reconocimiento de los componentes nucleolares. Otra evidencia de la colocación de DNA y RNA en el nucleolo proviene de la inmunolocalización de DNA en cortes ultrafinos teñidos con EDTA (Risueño y Testillano, 1994). El marcado anti-DNA se detectó en forma de pequeños grupos de partículas de oro localizados en ciertas regiones positivas a EDTA del CFD. También hemos empleado el anticuerpo anti-NOR90 que reconoce el *upstream binding factor* (UBF), un factor de transcripción asociado a la RNA polimerasa I, responsable de la síntesis del RNA ribosómico. El patrón de marcado fue semejante al de la localización de los híbridos DNA/RNA. En experimentos de doble marcado anti-híbridos DNA/RNA y anti-NOR90, se constató la colocación de algunas partículas de oro de diferente tamaño en zonas del CFD, en ocasiones próximas a los CFs. Tomados en conjunto, estos datos nos permiten suponer que la transcripción de los genes ribosómicos tiene lugar en ciertas regiones del CFD, en la proximidad de los CFs, pero no necesariamente restringida al borde entre los dos componentes fibrilares del nucleolo.

Un método alternativo al de Testillano y col. (1994) para localizar a nivel ultraestructural los lugares de transcripción ribosómica consiste en la incorporación in vivo de BrUTP en el RNA naciente y la posterior detección de Br-RNA mediante el empleo de anticuerpos específicos conjugados con oro. El marcado se localizó en el CFD, en regiones próximas a los CFs, tanto en células animales (Dundr y Raska,

1993; Hozák y col., 1994; Raska, 1995; Raska y col., 1995) como vegetales (Melcak y col., 1996), aunque en plantas no todo el marcado del CFD está asociado a CFs. Melcak y col., (1996) han descrito la existencia de dos dominios funcionales en el CFD mediante la aplicación del método de detección de Br-RNA para localizar el RNA ribosómico naciente en protoplastos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa*. Estos experimentos requieren una permeabilización con Triton X-100 para facilitar la entrada del precursor no isotópico del RNA. Esto produce un cambio en la estructura fina del nucleolo que se manifiesta por la aparición de dos dominios morfológicamente diferenciados en el CFD: uno de ellos es más electrodensso, mientras que el otro muestra un aspecto más fibrilar. El tratamiento con Triton es compatible con la síntesis de RNA ribosómico (Melcak y col., 1996). De hecho García-Blanco y col. (1995) utilizaron condiciones más drásticas para detectar Br-RNA en extendidos nucleares, con resultados satisfactorios. El marcado que detecta los lugares de incorporación de BrUTP en nucleolos de protoplastos de *Allium cepa* se localizó específicamente en el dominio electrodensso del CFD, mientras que no se encontró marcado significativo en el dominio fibrilar (Melcak y col., 1996). Este resultado así como la presencia de proteínas Ag-NOR y moléculas implicadas en transcripción y procesamiento (Risueño y Medina, 1986) apoya firmemente la idea de la existencia de una subcompartimentalización funcional en el CFD de plantas siendo la zona cercana a los centros fibrilares funcionalmente similar al CFD de células animales (Cerdido y Medina, 1995; Risueño y Medina, 1986; Risueño y Testillano, 1994; Shaw y col., 1995).

En base a la localización ultraestructural de DNA ribosómico, Br-RNA y proteínas como RNA polimerasa I y DNA topoisomerasa I, Hozák (1995) ha propuesto un modelo de la organización funcional del nucleolo, en el que define los CFs como el reservorio de genes ribosómicos inactivos, RNA polimerasa I, DNA topoisomerasa I y otros factores necesarios para la síntesis del RNA ribosómico. El desplazamiento del DNA molde sobre las polimerasas fijadas en los CFs daría lugar a la aparición del CFD según se sintetiza el RNA ribosómico. A medida que los transcritos maduran, el CFD se convierte en CG. La actividad transcripcional de los genes ribosómicos daría lugar de forma centrífuga a la aparición de los distintos componentes nucleolares.

La distribución de las zonas activas en transcripción es más amplia en plantas que en animales puesto que en aquéllas no siempre están asociadas a los CFs si no que también se encuentran incluidas en ciertas regiones del CFD (Medina y col., 1983; Melcak y col., 1996; Risueño y Testillano, 1994; Shaw y col., 1995). Según

Medina y col. (1983), los CFs contienen la cromatina de la región organizadora del nucleolo en estado transcripcionalmente inactivo, junto con una gran cantidad de proteínas. Estudios morfométricos han demostrado bajo condiciones fisiológicas y experimentales que el tamaño de los CFs es inversamente proporcional a la actividad transcripcional, y en un hipotético estado en que todos los genes ribosómicos se estuviesen transcribiendo no se observarían CFs, localizándose la cromatina ribosómica activa dispersa en el CFD (Medina y col., 1983). La localización *in situ* a nivel de microscopía confocal de la secuencia del *external transcribed spacer* (ETS), que detecta los pre-RNAs ribosómicos transcritos, ha demostrado que la mayor parte de la transcripción ribosómica ocurre en regiones amplias del interior nucleolar que, en estudios correlativos en el mismo tipo de nucleolos, se corresponden con la disposición del CFD en cortes ultrafinos (Shaw y col., 1995). Teniendo en cuenta los datos anteriores y que el número de genes ribosómicos es uno o dos órdenes de magnitud superior en plantas -13.000 por complemento diploide en *Allium* (Ingle y Sinclair, 1972)- que en animales, es lógico suponer que al haber más genes transcribiendo, la distribución nucleolar de las zonas activas sea más amplia que en animales y no esté restringida exclusivamente a la zona del CFD próxima a los CFs. En estados transcripcionalmente activos, fibras de DNA ribosómico se extenderían desde los CFs hacia en interior del CFD a la vez que los factores necesarios para la transcripción difundirían de los CFs a esas áreas activas del CFD (Risueño y Testillano, 1994). Retomando nuestros datos de la localización del DNA ribosómico mediante hibridación *in situ* a nivel de microscopía confocal, podemos interpretar el marcado disperso localizado en el interior nucleolar y revelado por el color azul, como la imagen de los genes activos o preparados para transcripción que a nivel ultraestructural daría lugar a un marcado concentrado en ciertas regiones del CFD. Las estructuras más brillantes, representadas por los colores verde y rojo y que hemos interpretado como CFs (homogéneos y heterogéneos, respectivamente), podrían representar acumulaciones de DNA ribosómico inactivo, mostrándose activos únicamente los genes dispuestos en su periferia donde, efectivamente, la microscopía confocal ha revelado la existencia de fibras de cromatina ribosómica dispersa. La disminución de la actividad transcripcional se manifiesta por una progresiva condensación de la cromatina ribosómica.

La fibrilarina es una proteína nucleolar que participa en el procesamiento temprano del RNA ribosómico (Kass y col., 1990; Tollervey y col., 1991). Varios autores han localizado esta proteína en el CFD del nucleolo (Cerdido y Medina, 1995; Osch y col., 1985; Pierron y col., 1989; Puvion-Dutilleul y col., 1991; Testillano y col.,

1992). En extendidos nucleares García-Blanco y col. (1995) han observado la colocación de transcritos ribosómicos nacientes y fibrilarina, lo cual sugiere que el procesamiento se inicia cotranscripcionalmente. Cerdido y Medina (1995) han localizado esta proteína en el borde entre el CFD y los CFs, el cual definen como activa en transcripción, y sugieren que la fibrilarina no es una proteína estructural si no que su presencia y distribución están relacionadas con la actividad transcripcional. En base a estos datos han establecido un modelo de la organización funcional del nucleolo en el que proponen la existencia de dos dominios funcionalmente diferentes en el CFD en función de su proximidad a los CFs. Datos previos del grupo (Testillano y col., 1992) y nuestros (Testillano y col. 1995a; González-Melendi y col., 1996) no nos permiten afirmar categóricamente que la distribución de la fibrilarina coincida exactamente con la localización de los dominios activos en transcripción del CFD, aunque no se puede descartar esa posibilidad. En ocasiones, se observa un marcado concentrado en ciertas regiones del CFD, pero en otros casos el marcado está disperso por el CFD.

#### 4.3.4. Distribución de RNA en el nucleolo

Hemos estudiado la distribución de RNA en el nucleolo mediante la inmunolocalización de RNA total, utilizando anticuerpos anti-RNA, e hibridación in situ, utilizando sondas que reconocen las secuencias 18S y 25S de la unidad ribosómica. Estudios anteriores en nuestro laboratorio habían demostrado una distribución heterogénea del marcado fluorescente de anticuerpos anti-RNA en el mismo material (Mena y col., 1994). A nivel ultraestructural el RNA total se distribuyó de forma desigual en el nucleolo. La aplicación del inmunomarcado sobre cortes de muestras tratadas con MA permitió identificar el CG como el compartimento nucleolar de mayor intensidad de marcado, mientras que la señal observada sobre el CFD fue moderada. Aunque la mayor parte del RNA localizado en el nucleolo mediante el empleo de anticuerpos anti-RNA es ribosómico, utilizamos la técnica de hibridación in situ para detectar específicamente secuencias de RNA ribosómico y comprobar si su distribución era semejante en ambos casos. La observación en microscopía confocal de proyecciones de distintas secciones ópticas de nucleolos en distintos estados de actividad reveló una distinta distribución de la fluorescencia. En algunos nucleolos la señal más intensa se localizó en zonas periféricas, mientras que en otros aparecía entremezclada con áreas de intensidad intermedia. A nivel ultraestructural comprobamos que el marcado no se distribuye homogéneamente en el nucleolo, de la misma forma que ocurre cuando empleamos anticuerpos anti-RNA. La intensidad

de partículas de oro es superior en el CG que en el CFD. Esta distribución heterogénea del marcado se mantiene en nucleolos con distintos tipos de actividad. El CG mantiene una intensidad de marcado superior que el CFD independientemente de cual sea su posición en el nucleolo, periférica o entremezclada con el CFD, en relación al estado de actividad transcripcional. Esta distinta distribución del marcado en el nucleolo no fue posible apreciarla en cortes de muestras no tratadas con MA (Olmedilla y col., 1993). Estos datos nos han permitido establecer una correlación entre las imágenes de microscopía confocal y electrónica. Las áreas de mayor intensidad de fluorescencia corresponderían al CG, mientras que las de intensidad intermedia revelarían el CFD. De este modo podemos inferir el estado de actividad transcripcional en función del patrón de marcado fluorescente que revela especies de RNA ribosómico.

##### **5. CAMBIOS EN LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL NÚCLEO DURANTE LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN DE *Capsicum annum* L.**

En el capítulo anterior hemos descrito la organización funcional del núcleo celular en diferentes momentos de actividad, relacionando la presencia y distribución de diferentes moléculas que participan en importantes funciones nucleares, con los cambios dinámicos en la actividad génica. Hemos aplicado los métodos de detección in situ de moléculas al estudio de la biología celular del polen, centrándonos en el análisis morfofuncional del núcleo. Estos métodos nos han permitido obtener un mayor conocimiento del metabolismo nuclear en relación a los cambios estructurales que son reflejo de los profundos cambios de la actividad génica durante la microsporogénesis y desarrollo del polen joven (Risueño y Medina, 1986; Risueño y col., 1988; Testillano y Risueño, 1988). El planteamiento y desarrollo de este estudio ha exigido el uso de técnicas citoquímicas, inmunocitoquímicas, reacciones moleculares realizadas in situ e hibridación in situ para detectar diferentes moléculas implicadas en procesos de replicación, transcripción y procesamiento de RNAs e identificar las estructuras subcelulares que albergan dichos procesos nucleares. Hemos realizado un seguimiento, tanto al microscopio óptico como electrónico, de distintas fases de la microgametogénesis, especialmente aquéllas en las que la inducción de embriogénesis es más fácil, para obtener información sobre su estado fisiológico.

A lo largo del ciclo celular la **cromatina** experimenta cambios estructurales que están relacionados con el desempeño de funciones nucleares tales como

replicación y transcripción. La existencia de una alternancia condensación-descondensación de la cromatina fue demostrada en 1963 (Mazia) y confirmada posteriormente (Rao y Hanks, 1980). Se ha descrito que después de la división hay una fase de descondensación, interrumpida en mitad de G1, hasta la mitad de la fase S. La cromatina se condensa progresivamente desde la mitad de la fase S hasta la siguiente mitosis (Nicolini y col., 1975). Hemos observado cambios en el patrón de condensación de la cromatina durante la interfase de la microspora, desde la fase de tetradra hasta la mitosis que confirman la existencia de un proceso de descondensación de la cromatina. El patrón de condensación de la cromatina experimenta cambios relacionados con la densidad del material fibrilo-granular de la **región intercromatínica**, siendo este material muy abundante cuando la cromatina está descondensada y escaso en estadios de cromatina condensada (Testillano y Risueño, 1988). La tinción de EDTA ilustra claramente este hecho. Este método citoquímico contrasta preferencialmente los RNPs mientras que las áreas ricas en cromatina aparecen blanqueadas. En núcleos activos la red fibrilo-granular de la región intercromatínica es densa y las áreas blanqueadas son pequeñas, mientras que en núcleos poco activos la densidad de la región intercromatínica es menor a la vez que las áreas blanqueadas son de mayor tamaño (comparar Figs. 15a y b). En la fase de tetradra, como resultado del proceso de descondensación de la cromatina que se inicia después de finalizada la meiosis, se observan dos estados morfofuncionales de la cromatina. En posiciones preferentemente periféricas encontramos grandes masas de cromatina y en el interior del núcleo la cromatina está más dispersa. En la región intercromatínica se observan abundantes fibras y gránulos en la proximidad de la cromatina dispersa. Este hecho corresponde a la reactivación de la transcripción extranucleolar que tiene lugar después de la meiosis. La acumulación de gránulos y fibras continúa durante la interfase de la microspora y disminuye al final de la misma. Cuando la microspora se aproxima a la profase de la primera división mitótica del polen, la región intercromatínica presenta escaso material fibrilo-granular mostrando áreas claras en su interior. Esto es coherente con el estado muy condensado de la cromatina en esta fase, que representa una inactividad transcripcional (Puvion y Viron, 1981).

Después de la división asimétrica de la microspora se forman las células vegetativa y generativa con distintos destinos. Las células vegetativa y generativa presentan una distinta actividad génica, una de cuyas manifestaciones más evidentes es el diferente estado de condensación de la cromatina, que es apreciable en cortes semifinos teñidos con DAPI. Hemos estudiado el patrón de cromatina en las células

vegetativa y generativa de granos de polen bicelulares jóvenes mediante la realización in situ de la reacción de TdT a nivel ultraestructural. Las partículas de oro revelan los lugares de incorporación de nucleótidos marcados a los extremos 3' hidroxilo libres expuestos en la superficie de los cortes. El núcleo vegetativo presenta un patrón de marcado en el que las partículas de oro se localizan sobre las pequeñas masas de cromatina condensada y las abundantes fibras de cromatina dispersa de la región intercromatínica. En cambio, en el núcleo generativo las masas de cromatina condensada son mayores y las fibras de cromatina dispersa son menos abundantes, según la distribución de las partículas de oro. La inmunolocalización de híbridos DNA/RNA en las fases estudiadas confirmó el proceso de reactivación de la transcripción durante la interfase de la microspora y las diferencias en la actividad génica entre las células vegetativa y generativa del grano de polen bicelular joven, inferidas de los cambios observados en la organización funcional de la cromatina y región intercromatínica en estas fases de la microsporogénesis. En efecto, en las fases tempranas de la interfase de la microspora, recién terminada la meiosis, se observa un abundante marcado, que localiza los híbridos DNA/RNA, en fibras de la región intercromatínica. En estadios posteriores el marcado es menos intenso, si bien constante, y desaparece cuando el núcleo se prepara para la mitosis. En el polen bicelular joven se observan diferencias de marcado con anticuerpos anti-híbridos DNA/RNA entre las células vegetativa y generativa. La distribución del marcado que localiza el DNA molde y el RNA recién sintetizado es más amplia en la célula vegetativa que en la generativa. La distribución espacial y temporal del marcado con anticuerpos anti-híbridos DNA/RNA, para localizar lugares de transcripción, coincide con la del marcado con anticuerpos anti-PCNA, que localizan lugares de replicación, durante la interfase de la microspora. Otros autores habían descrito previamente una relación funcional entre replicación y transcripción (Hassan y col., 1993). El estudio de los cambios en la estructura de la cromatina durante el ciclo celular no ha demostrado la existencia de una relación causa-efecto entre la descondensación de la cromatina y las funciones de transcripción. Si bien una descondensación de la cromatina es necesaria para que la transcripción pueda llevarse a cabo, también puede ser una consecuencia de este proceso (Lee y Garrard, 1991).

Los cambios en la organización del nucleolo durante la interfase de la microspora reflejan una reactivación progresiva de la función nucleolar (Risueño y col., 1988). Al comienzo del periodo S, en la fase de tetrada, el nucleolo está compuesto principalmente por CFD y una vacuola de reactivación, en conexión con los CFs, en cuyo interior son visibles gránulos semejantes a los pericromatínicos.

Esta morfología nucleolar es típica de un estado de reactivación de la transcripción ribosómica. En estadios posteriores la vacuola de reactivación desaparece y el CG se va haciendo cada vez más abundante y se entremezcla con el CFD. Los centros fibrilares son de tipo homogéneo y de pequeño tamaño. Hacia el final de la interfase de la microspora el nucleolo alcanza su máxima actividad y una gran vacuola de actividad, asociada al CG, es evidente en este tipo de nucleolos. Después de la mitosis, los nucleolos generativo y vegetativo están inactivos y se componen principalmente de CFD. Posteriormente el nucleolo vegetativo se activa progresivamente, adquiriendo CG y mostrando numerosos CFs homogéneos. El nucleolo generativo mantiene un estado de baja actividad transcripcional. Está principalmente compuesto por estructuras fibrilares rodeando masas de cromatina compacta de la región organizadora del nucleolo, formando un gran CF heterogéneo en su interior. Los cambios en la actividad transcripcional del nucleolo fueron estudiados mediante el empleo del anticuerpo anti-NOR90 que reconoce el factor UBF (*Upstream Binding Factor*) asociado a la RNA polimerasa I. La intensidad del marcado encontrada en distintos estadios de la microgametogénesis fue coherente con el estado de actividad transcripcional, reflejado por la organización nucleolar. Así, en nucleolos constituidos mayoritariamente por CFD, el marcado es poco intenso, mientras que en nucleolos cuyas características ultraestructurales reflejan una elevada tasa de biosíntesis de ribosomas, el marcado fue más intenso. De este modo hemos podido observar que al igual que ocurre con la transcripción extranucleolar, la transcripción de los genes ribosómicos se activa progresivamente desde el final de la meiosis hasta la primera mitosis del polen. Se observa un incremento en la intensidad de partículas de oro, que revelan UBF, desde la fase de tetrada hasta la de microspora vacuolada tardía en la que la actividad transcripcional es elevada. Después de la mitosis, recién formado el polen bicelular joven los nucleolos vegetativo y generativo están inactivos y es escaso el marcado con anticuerpos anti-NOR90.

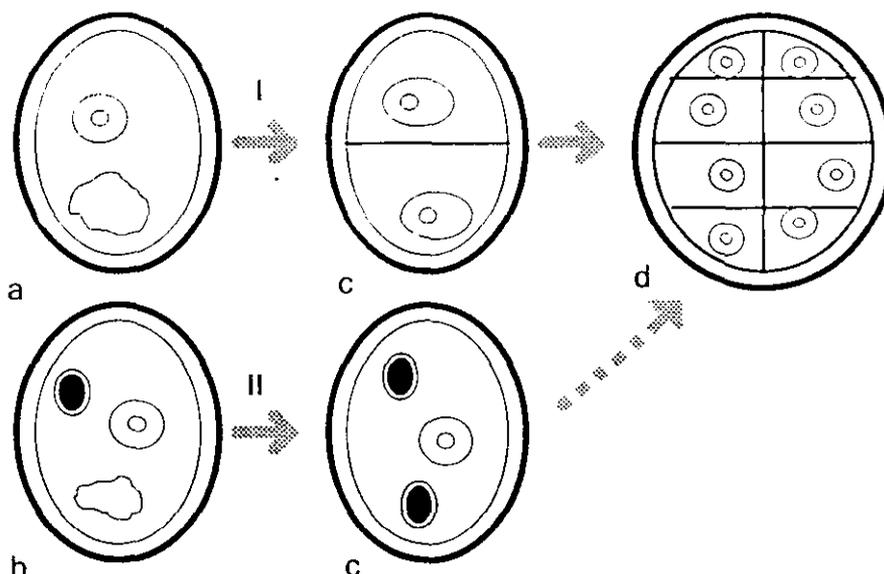
La localización ultraestructural específica de rRNA mediante hibridación in situ mostró claras diferencias en el metabolismo del rRNA en distintas fases de la microgametogénesis. En el estadio de microspora vacuolada la señal de hibridación que reconoce el RNA ribosómico 25S es intensa en el nucleolo y nucleoplasma. Estos resultados ponen de manifiesto que se trata de una fase de intensa actividad biosintética de prerribosomas. En el grano de polen bicelular joven se observaron diferencias de intensidad de marcado en el nucleoplasma entre las células vegetativa y generativa, siendo superior en el núcleo generativo. La menor actividad metabólica

del núcleo generativo explicaría la abundancia de prerribosomas en el nucleoplasma cuyo transporte hacia el citoplasma sería más lento.

## 6. ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DEL POLEN EMBRIOGÉNICO

El seguimiento de la progresión de los cultivos de polen mediante tinción con DAPI mostró que bajo las dos condiciones de estrés ensayadas (semiayuno y choque térmico) se produce un cambio en el programa de desarrollo gametofítico hacia la vía esporofítica. A partir del segundo día de cultivo en medio líquido de microsporas vacuoladas tardías y granos de polen bicelulares jóvenes, contenidos en las anteras seleccionadas, se observan granos de polen bicelulares atípicos que presentan dos núcleos con la misma forma, tamaño y grado de condensación de la cromatina, según la intensidad de fluorescencia en aplastados teñidos con DAPI. Los granos de polen bicelulares con dos núcleos semejantes continúan el proceso de desarrollo esporofítico inducido bajo condiciones de estrés dando lugar a granos de polen multinucleados o proembriones. Este resultado sugiere que la primera manifestación morfológica del proceso de embriogénesis del polen consiste en una división simétrica del núcleo de la microspora. Este hecho había sido descrito previamente en cultivos de microsporas de *Brassica* después de choque térmico debido a una fragmentación de la vacuola que produce la pérdida de la polaridad de la microspora (Hause y col., 1993; Telmer y col., 1993; Zaki y Dickinson, 1990, 1991). Sin embargo, recientemente Touraev y col. (1995) han demostrado el mantenimiento del desarrollo gametofítico después de la inducción de división simétrica del núcleo en microsporas de tabaco. Estos resultados no permiten responder a la cuestión de si la división simétrica es causa o efecto de la inducción embriogénica.

Debido a que la población de partida para iniciar los cultivos no es homogénea y en ella se encuentran granos de polen bicelulares jóvenes, ocasionalmente hemos encontrado, aunque con muy baja frecuencia, granos de polen multicelulares en los que aparentemente, según el grado de condensación de la cromatina en aplastados teñidos con DAPI, las divisiones embriogénicas tienen lugar a partir de la célula generativa (González-Melendi y col., 1995, 1996; Testillano y col., 1995). No se puede excluir por tanto una respuesta embriogénica del polen bicelular joven, aunque se desconoce si estos granos multicelulares progresan hacia proembriones. Las posibles rutas embriogénicas en pimiento se ilustran en el siguiente gráfico (Figura II).



**Figura II:** Esquema de las posibles rutas embriogénicas observadas en *Capsicum annum* L. I: Ruta principal que implica la división del núcleo de la microspora vacuolada tardía. II: Ruta secundaria que implica la división de uno de los núcleos del grano de polen bicelular joven. a: microspora vacuolada tardía; b: grano de polen bicelular joven; c: grano de polen multicelular; d: proembrión.

En ocasiones hemos observado en los cultivos la presencia de microsporas cuyos núcleos presentaban un tamaño igual o superior al de los dos núcleos semejantes de granos bicelulares atípicos, que podrían originarse por duplicaciones sucesivas del material genético sin la ocurrencia de cariocinesis.

Los datos anteriores sugieren que la fase de microspora vacuolada tardía es clave en el proceso de inducción de embriogénesis en *Capsicum* (González-Melendi y col., 1995, 1996). La caracterización de su estado fisiológico mediante los métodos de detección in situ de moléculas y procesos, utilizados en esta Tesis, han revelado que este es un estadio de elevada actividad transcripcional. Además la confirmación por inmunomarcado con anti-PCNA de que los núcleos de las microsporas vacuoladas tardías están finalizando el proceso de replicación del DNA, facilitaría su reprogramación. El tratamiento de estrés produciría de alguna manera el cambio en el plano de división del núcleo replicado de la microspora vacuolada tardía dando lugar a granos de polen bicelulares atípicos con dos núcleos con aspecto semejante que posteriormente se desarrollan originando granos de polen multinucleados.

El seguimiento que realizamos de granos de polen embriogénicos mediante estudios ultraestructurales en distintos momentos del proceso de desarrollo esporofítico, en base a la utilización de métodos de procesamiento que permitieran una adecuada preservación estructural, permitió confirmar que los dos núcleos de los granos de polen embriogénicos presentaban un semejante estado de condensación de la cromatina. El análisis a nivel de microscopía electrónica de su organización nuclear (patrón de cromatina, región intercromatínica y nucleolo) mostró características propias de células vegetales en proliferación (De la Torre y col., 1975; Fadón, 1993; Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1979; Risueño y col., 1982; Testillano y col., 1993b). El citoplasma es denso, reflejando un metabolismo activo, al igual que en células proliferantes. Estas características ultraestructurales son muy distintas de las mostradas por los granos de polen bicelulares gametofíticos. Las células vegetativa y generativa muestran claras diferencias en su organización nuclear que reflejan la diferente actividad génica en ambas (Dinis y Mesquita, 1992, 1994; Fadón, 1993; Risueño y Medina, 1986; Testillano y col., 1995). Las diferencias en la organización funcional entre los granos de polen bicelulares embriogénicos y gametofíticos ilustran las diferencias en la actividad génica de los núcleos que siguen el desarrollo esporofítico o gametofítico.

La presencia de depósitos densos en las vacuolas citoplásmicas de granos de polen embriogénicos en *Datura* fue descrita como un marcador del proceso de embriogénesis (Sangwan y Camefort, 1983). Sin embargo nuestro estudio del proceso de desarrollo gametofítico en *Capsicum* ha demostrado la existencia de depósitos electrodensos en el interior de las vacuolas citoplásmicas en distintos momentos del proceso de desarrollo gametofítico de lo cual concluimos que, al menos en nuestro material, su presencia no constituye un marcador de embriogénesis (Fadón, 1993; González-Melendi y col., 1995). El estudio ultraestructural de granos de polen multicelulares en fases más avanzadas del desarrollo esporofítico mostraron un diferente grosor de las paredes celulares que separan células dentro de un mismo grano de polen embriogénico. Esta característica ultraestructural de las paredes celulares es una constante durante el crecimiento y desarrollo radicular y permite distinguir células formadas en distintos ciclos de división (Risueño y col., 1968). De la misma forma el diferente grosor de las paredes celulares dentro de granos de polen multicelulares indica células formadas en diferentes ciclos de división que ocurren sucesivamente durante el desarrollo esporofítico.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1.- La adecuación del crioprocesamiento de muestras a polen de pimiento permitió el mantenimiento de las propiedades químicas y antigénicas de las mismas, habiéndose localizado proteínas implicadas en distintas funciones nucleares tales como replicación, transcripción y procesamiento de RNAs, así como los genes ribosómicos y sus transcritos.

2.- Hemos mejorado el contraste y reconocimiento de los distintos compartimentos nucleares en cortes de Lowicryl mediante la aplicación de técnicas citoquímicas específicas o preferenciales. Hemos descrito que el tratamiento de metilación-acetilación es un método citoquímico que permite una mejor definición de los subcompartimentos celulares sin afectar la reactividad antigénica y química de las muestras, siendo compatible con inmunocitoquímica e hibridación in situ. Esto ha proporcionado un reconocimiento inequívoco de las estructuras marcadas en ensayos de inmunocitoquímica e hibridación in situ.

3.- Hemos definido cambios dinámicos en la función nuclear y determinado relaciones estructura-función en el núcleo celular durante el proceso de maduración in vivo del polen y fases del ciclo celular mediante la combinación de métodos citoquímicos y técnicas de localización in situ de moléculas permitiendo una correcta asignación del marcado con oro en experimentos de inmunocitoquímica e hibridación in situ.

4.- Hemos propuesto el método de localización del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en microscopía electrónica como una alternativa más sencilla y rápida que la incorporación in vivo de BrdU para localizar lugares de replicación y estudiar la dinámica de la fase S del ciclo celular en procesos de desarrollo en plantas con una larga interfase, como la de la microspora. De este modo hemos descrito dos momentos principales de síntesis de DNA durante la interfase postmeiótica de la microspora, al principio y final de la misma.

5.- Hemos determinado que los procesos de transcripción y procesamiento del RNA heterogéneo en la región intercromatínica están ordenados de forma

vectorial definiendo dos dominios, en relación a su proximidad a la cromatina condensada, estructural y funcionalmente diferentes.

6.- Hemos determinado que los cambios en el patrón de condensación de la cromatina están relacionados con las variaciones en la densidad de estructuras ribonucleoproteicas fibrilares y granulares en la región intercromatínica, que reflejan el estado de actividad nuclear.

7.- Hemos relacionado la organización funcional y distribución de la cromatina ribosómica en el nucleolo con la tasa de biosíntesis de ribosomas mediante la localización de los genes ribosómicos y sus transcritos mediante hibridación *in situ* en estadios del desarrollo o momentos del ciclo celular con distinta organización nucleolar y actividad transcripcional.

8.- Hemos obtenido reconstrucciones tridimensionales del marcado en experimentos de hibridación *in situ* RNA/RNA y RNA/DNA y relacionado la distinta organización de estructural y funcional de la cromatina ribosómica y la distinta distribución de los transcritos con el estado de actividad nucleolar mediante la observación de muestras en microscopía confocal y el posterior tratamiento de las imágenes .

9.- Hemos determinado que los estadios de la microspora próximos a la mitosis son los más eficientes para inducir una respuesta embriogénica en cultivos *in vitro* y caracterizado su estado fisiológico mediante métodos citoquímicos, inmunocitoquímicos e hibridación *in situ*.

10.- Hemos definido un proceso de desdiferenciación en el polen embriogénico en base a las características ultraestructurales que comparte con células meristemáticas en proliferación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bouteille, M., Laval, M., & Dupy-Coin, A.M. (1974). Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. In H. Busch (Ed.), *The Cell Nucleus* (pp. 3-71). New York: Academic Press.
- Bradford, M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Ciclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase  $\delta$ . *Nature*, **326**, 515-517.
- Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol*, **105**, 1549-1554.
- Burgess, J. (1970). Cell shape and mitotic spindle formation in the generative cell of *Endymion non-scriptus*. *Planta*, **95**, 72-85.
- Celis, J.E. & Celis, A. (1985). Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 3262-3266.
- Cerdido, A. & Medina, F.J. (1995). Subnuclear localization of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, **103**, 625-634.
- Chan, E.K.L., Imai, H., Hamel, J.C., & Tan, E.M. (1991). Human autoantibody to RNA Polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med*, **174**, 1239-1244.
- Christensen, M.E., Moloo, J., Swischuk, J., & Schelling, M.E. (1986). Characterization of the nucleolar protein B-36 using monoclonal antibodies. *Exp Cell Res*, **166**, 77-93.
- Chuong, P.V. & Beversdorf, W.D. (1985). High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Sci*, **39**, 219-226.
- Citterio, S., Sgorbati, S., Levi, M., Colombo, B.M., & Sparvoli, E. (1992). PCNA and total nuclear protein content as markers of cell proliferation in pea tissue. *J Cell Sci*, **102**, 71-78.
- Cogliati, R. & Guatier, A. (1973). Mise en evidence de l'ADN et des polysaccharides a l'aide d'un nouveau reactif de type Schiff. *C R Acad Sci Paris D*, **276**, 3041-3044.
- Comings, D.E. & Okada, T.A. (1973). DNA replication and the nuclear membrane. *J Mol Biol*, **75**, 609-618.

- Conconi, A., Sogo, J.M., & Ryan, C.A. (1992). Ribosomal gene clusters are uniquely proportioned between open and closed chromatin structures in both tomato leaf cells and exponentially growing suspension cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 5256-5260.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., & Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.
- Cox, K.H., De Leon, D.V., Angerer, L.M., & Angerer, R.C. (1984). Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol*, **101**, 485-502.
- Custers, J.B.M., Cordewener, J.H.G., Nöllen, Y., Dons, J.J.M., & Van Lookeren Campagne, M.M. (1994). Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, **13**, 267-271.
- De la Peña, A., Lörz, H., & Schell, J. (1987). Transgenic rye plants obtained by DNA injection into young floral tillers. *Nature*, **325**, 274
- De la Torre, C. & González-Fernández, A. (1979). Cell cycle mapping by irradiating cells with Bromosubstituted DNA segments. *Photochem Photobiol*, **29**, 977-981.
- De la Torre, C., González-Fernández, A., & Giménez-Martín, G. (1989). Stringency at four regions of the plant cell cycle where proteins regulating its progression are synthesized. *J Cell Sci*, **94**, 259-265.
- De la Torre, C., Sacristán-Garate, A., & Navarrete, M.M. (1975). Structural changes in chromatin during interphase. *Chromosoma*, **51**, 183-198.
- De la Torre, C., Sans, J., Aller, P., & González-Fernández, A. (1985). Replication time of the genome portions involved in a G<sub>2</sub> transition points in meristems. *Eur J Cell Biol*, **37**, 216-219.
- Deerinck, T.J., Martone, M.E., Lev-Ram, V., Green, D.P., Tsien, R.Y., Spector, D.L., Huang, S., & Ellisman, M.H. (1994). Fluorescence photooxidation with eosin: a method for high resolution immunolocalization and in situ hybridization detection for light and electron microscopy. *J Cell Biol*, **126**, 901-910.
- Delseny, M., Cooke, R., & Penon, P. (1983). Sequence heterogeneity in radish nuclear ribosomal RNA genes. *Plant Sci Lett*, **30**, 107-119.
- Derenzini, M., Farabegoli, F., & Trerè, D. (1993). Localization of DNA in the fibrillar components of the nucleolus: a cytochemical and morphometric study. *J Histochem Cytochem*, **41**, 829-836.

- Derenzini, M., Pession, A., Licastro, F., & Novello, F. (1985). Electronmicroscopical evidence that ribosomal chromatin of human circulating lymphocytes is devoid of histones. *Exp Cell Res*, **157**, 50-62.
- Derenzini, M., Thiry, M., & Goessens, G. (1990). Ultrastructural cytochemistry in mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem*, **38**, 1237-1256.
- Dinis, A.M. & Mesquita, J.F. (1992). The ultrastructure of the vegetative cell during the maturation of the *Magnolia soulangeana* Soul. pollen grain. In L. Megías-Megías, M.I. Rodríguez-García, A. Rios, & J.M. Arias (Eds.), *Electron Microscopy 92* (pp. 429-430). Granada: Universidad de Granada.
- Dinis, A.M. & Mesquita, J.F. (1994). Intimate association between the generative cell and endoplasmic reticulum during the in vitro lag period of *Magnolia x Soulangeana* pollen germination. *Int J Plant Sci*, **155**, 158-166.
- Dundr, M. & Raska, I. (1993). Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus. *Exp Cell Res*, **208**, 275-281.
- Eilat, D. & Fischer, R. (1991). Recurrent utilization of genetic elements in V regions of antinucleic acid antibodies from autoimmune mice. *J Immunol*, **147**, 361-368.
- Eshbaugh, W.H., Guttman, S.I., & McLeod, M.J. (1983). The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species. *J Ethnobiol*, **3**, 49-54.
- Fadón, B. (1993). Estudio ultraestructural y detección in situ de macromoléculas durante el desarrollo del polen de *Capsicum annuum* L. en relación al proceso de inducción de la androgénesis in vitro. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Fakan, S., Leser, G., & Martin, T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol*, **98**, 358-363.
- Fakan, S. & Puvion, E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol*, **65**, 255-299.
- Fakan, S., Puvion, E., & Spohr, G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp Cell Res*, **99**, 155-164.
- Feijoo, J.A. & Pais, M.S.M. (1988). Ultrastructural modifications of plastids and starch metabolism during the microsporogenesis of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, **61**, 215-219.
- Frankel, R., Izhar, S., & Nitsen, J. (1969). The timing of calose activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Biochem Genet*, **3**, 451-455.
- García-Blanco, M., Miller, D.D., & Sheetz, M. (1995). Nuclear spreads: I. Visualization of bipartite ribosomal RNA domains. *J Cell Biol*, **128**, 15-27.

- Garrido, D., Charvat, B., Benito-Moreno, R.M., Alwen, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1991). Pollen culture for haploid plant formation in tobacco. In I. Negrutiu & G. Gharti-Chhetri (Eds.), *A laboratory guide for cellular and molecular plant biology* (pp. 59-69). Basel, Boston: Birkhäuser-Verlag.
- Garrido, D., Eller, N., Heberle-Bors, E., & Vicente, O. (1993). De novo transcription of specific mRNAs during the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex Plant Reprod*, **6**, 40-45.
- Garrido, D., Vicente, O., Heberle-Bors, E., & Rodríguez-García, M.I. (1995). Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, **186**, 220-230.
- Gas, N., Inschauspé, G., Azum, M.C., & Stevens, B.J. (1984). Bismuth staining of a nucleolar protein. *Exp Cell Res*, **151**, 447-457.
- Giménez-Martín, G., Risueño, M.C., & Sogo, J.M. (1970). Development of the vegetative cell in the pollen grain. *Cytologia*, **35**, 609-621.
- Goessens, G. (1984). Nucleolar structure. *Int Rev Cytol*, **87**, 107-158.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Ahmadian, P., Fadón, B., & Risueño, M.C. (1996). New *in situ* approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annum* L. *Eur J Cell Biol*, **69**, 373-386.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O., & Risueño, M.C. (1995). In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma*, **187**, 60-71.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Mena, C.G., Muller, S., & Risueño, M.C. (2000). Histones and DNA distribution in plant nuclei: a cytochemical and immunocytochemical study. (*en preparación*).
- Gorska-Brylarska, A. (1967). Transitory callose envelope surrounding the generative cell in pollen grains. *Acta Soc Bot Poloniae*, **36**, 419-422.
- Griffiths, G. (1993). *Fine structure immunocytochemistry*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K., & Schweizer, D. (1991). rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana* structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *J Mol Biol*, **221**, 1209-1222.
- Guha, S. & Maheshwari, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, **204**, 497
- Guha, S. & Maheshwari, S.C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature*, **212**, 97-98.

- Guthrie, C. & Patterson, B. (1988). Spliceosomal snRNAs. *Ann Rev Genet*, **22**, 387-419.
- Hadjiolov, A.A. (1985). *The nucleolus and ribosome biogenesis*. Viena: Springer-Verlag.
- Hassan, A.B., Errinton, R.J., White, N.S., Jackson, D.A., & Cook, P.R. (1993). Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *J Cell Sci*, **107**, 425-434.
- Hause, B., Hause, G., Pecham, P., & Van Lammeren, A.A.M. (1993). Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. *Cell Biol Int*, **17**, 153-168.
- Hause, G., Cordewener, J.H.G., Ehrmanova, M., Hause, B., Binarova, P., Van Lookeren Campagne, M.M., & Van Lammeren, A.A.M. (1995). Cell cycle dependent distribution of phosphorylated proteins in microspores and pollen of *Brassica napus* L., detected by the monoclonal antibody MPM-2. *Protoplasma*, **187**, 117-126.
- Hayat, M.A. (1989). *Principles and techniques of electron microscopy*. Houndmills, London: MacMillan Press.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., & Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active cromatin. *EMBO J*, **7**, 1395-1402.
- Heberle-Bors, E. (1985). In vitro haploid formation from pollen: a critical review. *Theor Appl Genet*, **71**, 361-374.
- Heberle-Bors, E. (1989). Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. *Sex Plant Reprod*, **2**, 1-10.
- Heberle-Bors, E., Benito-Moreno, R.M., Alwen, A., Stöger, E., & Vicente, O. (1990). Transformation of pollen. In H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plaas, & J. Van Aartrijk (Eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* (pp. 244-251). Dordrecht, Boston, London: Kluwer.
- Hernández-Verdun, D. (1986). Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Meth Achiev Exp Path*, **12**, 26-62.
- Hernández-Verdun, D. (1991). The nucleolus today. *J Cell Sci*, **99**, 465-471.
- Hernández-Verdun, D., Quintana, C., Masson, C., Gautier, T., & Arnoult, J. (1991). Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for visualizing of nuclear ultrastructure and for immunodetection in HeLa cells. *Biol Cell*, **72**, 121-132.
- Herrero, M. & Dickinson, H.G. (1979). Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *J Cell Scie*, **36**, 1-18.

- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Fadón, B., & Risueño, M.C. (1995a). The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp Cell Res*, **221**, 41-54.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., & Risueño, M.C. (1995b). The methylation-acetylation (MA) method, an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. *J Struct Biol*, **114**, 123-139.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Fadón, B., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., & Risueño, M.C. (1993a). Immunolocalization of nuclear antigens and ultrastructural cytochemistry on tapetal cells of *Scilla peruviana* and *Capsicum annum*. *Pl Syst Evol*, suppl. **7**, 75-90.
- Testillano, P.S., Gorab, E., & Risueño, M.C. (1994). A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem*, **42**, 1-10.
- Testillano, P.S. & Risueño, M.C. (1988). Evolution of nuclear interchromatin structures during microspore interphase periods. In M. Cresti, P. Gori, & E. Pacini (Eds.), *Sexual reproduction in higher plants* (pp. 151-156). Berlin, Heilderberg: Springer-Verlag.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., López-Iglesias, C., Olmedilla, A., Christensen, M.E., & Risueño, M.C. (1992). Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. *Chromosoma*, **102**, 41-49.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Fuchs, J.P., & Risueño, M.C. (1993b). Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain containing snRNPs in plant cells. A cytochemical and immunoelectron microscopy study. *Eur J Cell Biol*, **61**, 349-361.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.A., Tandler, C.J., & Risueño, M.C. (1991). A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem*, **39**, 1427-1438.
- Thiry, M. (1991). DNase I-sensitive sites within the nuclear architecture visualized by immunoelectron microscopy. *DNA and Cell Biology*, **10**, 169-180.
- Thiry, M. (1992a). New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6195-6200.
- Thiry, M. (1992b). Highly sensitive immunodetection of DNA on sections of exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non isotopic nucleotide analogues. *J Histochem Cytochem*, **40**, 411-419.
- Thiry, M. (1995a). The interchromatin granules. *Histol Histopathol*, **10**, 1035-1045.

- Jordan, E.G., Timmis, J.V., & Trewaras, A.J. (1980). The plant nucleus. In N.E. Tolbert (Ed.), *The biochemistry of plants* (pp. 489-588). New York, London: Academic Press.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A., & Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of pre-ribosomal RNA processing. *Cell*, **60**, 897-908.
- Kitagawa, Y. & Stollar, B.D. (1982). Comparison of poly(A)-poly(dT) and poly(I)-poly(dC) as immunogens for the induction of antibodies to DNA-RNA hybrids. *Mol Immunol*, **19**, 413-420.
- Kornberg, R.D. & Klug, A. (1981). The nucleosome. *Sci Amer*, **244**, 52-64.
- Kott, L.S., Polsoni, L., & Beversdorf, W.D. (1988). Pre- and postmitotic cytological events in isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Can J Bot*, **66**, 1658-1664.
- Kyo, M. & Harada, H. (1986). Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*, **168**, 427-432.
- Kyo, M. & Harada, H. (1990). Scientific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta*, **182**, 58-63.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafontaine, J.G. (1968). Structural components of the nucleolus in mitotic plant cell. In A.J. Dalton & F. Haguenu (Eds.), *The nucleus* (pp. 152-198). New York, London: Academic Press.
- Lee, M.S. & Garrard, W.T. (1991). Transcription-induced nucleosome splitting: an underlying structure for DNase I. *EMBO J*, **10**, 607-615.
- Levitt, A., Axel, R., & Cedar, H. (1979). Nick translation of active genes in intact nuclei. *Dev Biol*, **69**, 496-505.
- Lichter, R. (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z Pflanzenphysiol*, **103**, 427-434.
- Lombardi, L., Prenna, G., Okoliesanyi, L., & Gautier, A. (1971). Electron staining with uranyl acetate: possible role of free amino groups. *J Histochem Cytochem*, **19**, 161-168.
- Lührmann, R. (1988). snRNP proteins. In M.L. Birnstiel (Ed.), *Structure and function of major and minor snRNPs* (pp. 71-99). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lührmann, R., Kastner, B., & Bach, M. (1990). Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *BBA*, **1087**, 265-292.
- Maheshwari, S.C., Rashid, A., & Tayagi, A.K. (1982). Haploids from pollen grains. Retrospect and prospect. *Am J Bot*, **69**, 865-879.

- Maniatis, T. & Reed, R. (1987). The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature*, **325**, 673-678.
- Mascarenhas, J. (1989). The male gametophyte of flowering plants. *The Plant Cell*, **1**, 657-664.
- Mascarenhas, J. & Bell, E. (1970). RNA synthesis during development of the male gametophyte of *Tradescantia*. *Dev Biol*, **21**, 475-490.
- Mascarenhas, J.P., Eisenberg, A., Stinson, J.S., Willing, R.P., & Pe, M.E. (1985). Genes expressed during pollen development. In I. Sussex, A. Ellingboe, M. Crouch, & R. Malmberg (Eds.), *Plant cell/cell interactions* (pp. 19-23). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.
- Mattaj, I.W. (1990). Splicing stories and poly (A) tales: an update on RNA processing and transport. *Current Opinion in Cell Biology*, **2**, 528-538.
- Mazia, D. (1963). Synthetic activities leading to mitosis. *J Cell Comp Physiol*, **62** (suppl.1), 123-140.
- McCormick, S. (1993). Male gametophyte development. *The Plant Cell*, **5**, 1265-1275.
- McGhee, J.D. & Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Ann Rev Biochem*, **49**, 1115-1156.
- Medina, F.J., Risueño, M.C., & Moreno Díaz de la Espina, S. (1983). 3-D reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cells in relation to nucleolar activity. *Biol Cell*, **48**, 31-38.
- Medina, F.J. (1979). *Ultraestructura y dinámica de la megasporogénesis en Pisum sativum L.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Medina, F.J. & Risueño, M.C. (1980). Some aspects of ovular development during megasporogenesis in *Pisum sativum*. *Experientia*, **36**, 657-658.
- Melcak, I., Risueño, M.C., & Raska, I. (1996). Ultrastructural non-isotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *J Struct Biol*, en prensa.
- Mena, C.G., Testillano, P.S., González-Melendi, P., Gorab, E., & Risueño, M.C. (1994). Immunoelectron microscopy of RNA combined with nucleic acid cytochemistry in plant nucleoli. *Exp Cell Res*, **212**, 393-408.
- Morrison, R.A. & Evans, D.A. (1988). Haploid plants formation from tissue culture: new plant varieties in a shortened time. *Biotechnology*, **6**, 684-690.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., & Evans, D.A. (1986). Pepper. In D.A. Evans, W.R. Sharp, & P.V. Ammirato (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture* (pp. 552-573). New York: McMillan.

- Mulcahy, D.L. & Mulcahy, G.B. (1983). Pollen selection: an overview. In D.L. Mulcahy & E. Ottaviano (Eds.), *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding* (pp. xv-xvii). New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Muller, S., Chaix, M.L., Briand, J.P., & Van Regenmortel, M.H.V. (1991). Immunogenicity of free histones and of histones complexed with RNA. *Mol Immunol*, **28**, 763-772.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **15**, 473-479.
- Nicolini, C., Ajiro, K., Borun, T.W., & Baserga, R. (1975). Chromatin changes during the cell cycle of HeLa cells. *J Biol Chem*, **250**, 3381-3385.
- Ohta, Y. (1986). High-efficiency transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 715-719.
- Olmedilla, A., Testillano, P.S., Raska, I., & Risueño, M.C. (1992). *In situ* nick translation and anti BrdU techniques as convenient tools to study the functional regions of chromatin in plants. In L. Megías-Megías, M.I. Rodríguez-García, A. Rios, & J.M. Arias (Eds.), *Electron Microscopy 1992* (pp. 193-194). Granada: Universidad de Granada.
- Olmedilla, A., Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Muller, S., & Risueño, M.C. (1991). Simultaneous detection of histones and DNA in plant nuclei by immunogold labelling and NAMA-Ur. In S. Fakan (Ed.), *Libro de resúmenes del 12th European Workshop on the Cell Nucleus* (pp. 67) Les Diablerets. Suiza.
- Olmedilla, A., Testillano, P.S., Vicente, O., Delseny, M., & Risueño, M.C. (1993). Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli. RNA/RNA *in situ* hybridization, autoradiography and cytochemistry. *J Cell Sci*, **106**, 1333-1346.
- Osch, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H., & Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell*, **54**, 123-134.
- Pechan, P. & Keller, W.A. (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant*, **74**, 377-384.
- Pechan, P.M., Bartels, D., Brown, D.C.W., & Schell, J. (1991). Messenger-RNA and protein changes associated with the induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta*, **184**, 161-165.
- Peddada, L. & Mascarenhas, J. (1975). 5S ribosomal RNA synthesis during pollen development. *Dev Growth Diff*, **17**, 1-8.
- Pierron, G., Pedron, J., Schelling, M., & Christensen, M.E. (1989). Immunoelectron microscopic localization of the nucleolar protein B-36 (fibrillarin) during the cell cycle of *Physarum polycephalum*. *Biol Cell*, **65**, 119-126.

- Polak, J.M. & Priestley, J.V. (1992). *Electron microscopic immunocytochemistry: principles and practice*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Pretova, A., Ruijter, N.C.A., Van Lammeren, A.A.M., & Schel, J.H.N. (1993). Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L.. *Euphytica*, **65**, 61-69.
- Puvion, E. & Moyne, G. (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp Cell Res*, **115**, 79-88.
- Puvion, E. & Viron, A. (1981). In situ structural and functional relationships between chromatin pattern and RNP structures involved in non-nucleolar chromatin transcription. *J Ultr Res*, **74**, 351-360.
- Puvion, E., Viron, A., Assens, C., Leduc, E.H., & Jeanteur, P. (1984). Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells. *J Ultrastruct Res*, **87**, 180-189.
- Puvion-Dutilleul, F. (1993). Procedures of in situ nucleic acid hybridization to detect viral DNA and RNA in cells by electron microscopy. In Morel.G. (Ed.), *Hybridization techniques for electron microscopy* (pp. 269-299). Boca Raton: CRC Press.
- Puvion-Dutilleul, F. & Laithier, M. (1987). Localization of highly phosphorylated proteins in cells altered by *Herpes simplex* virus infection. *Biol Cell*, **61**, 129-139.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M.E., & Bachellerie, J.P. (1991). Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur J Cell Biol*, **56**, 178-186.
- Quintana, C. (1994). Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron*, **25**, 63-99.
- Raghavan, V. (1986). *Embryogenesis in angiosperms. A developmental and experimental study*. Cambridge, London, New York: Cambridge University Press.
- Rao, P.N. & Hanks, S.K. (1980). Chromatin structure during the prereplicative phases in the life cycle of mammalian cells. *Cell Biophys*, **2**, 327-337.
- Raska, I. (1995). Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *J Cell Biochem*, **59**, 11-26.
- Raska, I., Dundr, M., & Koberna, K. (1992). Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biol Int Rep*, **16**, 771-789.
- Raska, I., Dundr, M., Koberna, K., Melcak, I., Risueño, M.C., & Török, I. (1995). Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centres or dense fibrillar components?. A critical appraisal. *J Struct Biol*, **114**, 1-22.

- Raska, I., Koberna, K., Jarník, M., Petrasovicova, V., Bednar, J., Raska, K., & Bravo, R. (1989). Ultrastructural immunolocalization of Ciclin/PCNA in synchronized 3T3 cells. *Exp Cell Res*, **184**, 81-89.
- Raska, I., Salamin Michel, L., Jarník, M., Dundr, M., Fakan, S., Gasser, S., Gassman, M., Hübscher, U., Izaurralde, E., Martínez, E., Richter, A., & Dubochet, J. (1991). Ultrastructural cryoimmunocytochemistry is a convenient tool for the study of DNA replication in cultured cells. *J Electron Microscopy Tech*, **18**, 91-105.
- Reeves, R. (1984). Transcriptionally active chromatin. *Biochimica Biophysica Acta*, **782**, 343-393.
- Renau-Piqueras, J., Zaragoza, R., de Paz, P., Megías, L., & Guerri, C. (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopy study. *J Histochem Cytochem*, **37**, 229-240.
- Reyes, J., Testillano, P.S., & Risueño, M.C. (1994). The BrdU immunogold labelling to localize replicated DNA in plant cell nuclei. In B. Jouffrey & C. Colliex (Eds.), *Electron Microscopy 1994* (pp. 451-452). Les Ulis: Les Editions de Physique.
- Reynolds, T.L. (1990). Ultrastructure of pollen embryogenesis. In Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12. Haploids in Crop Improvement I* (pp. 66-82). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.
- Rigby, P., Dieckmann, M., Rhodes, C., & Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*, **113**, 237-251.
- Risueño, M.C., Giménez Martín, G., & López-Saez, J. (1968). Development of the middle lammella in rib meristem cells. *Experientia*, **24**, 514-516.
- Risueño, M.C., Giménez-Martín, G., López-Sáez, J., & Rodríguez-García, M.I. (1969). Origin and development of sporopollenin bodies. *Protoplasma*, **67**, 361-374.
- Risueño, M.C. & Medina, F.J. (1986). The nucleolar structure in plant cells. *Cell Biol Rev*, **7**, 1-140.
- Risueño, M.C., Medina, F.J., & Moreno Díaz de la Espina, S. (1982). Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J Cell Sci*, **58**, 313-329.
- Risueño, M.C. & Moreno Díaz de la Espina, S. (1979). Ultrastructural and cytochemical study of the nucleus of the dormant root meristematic cells. *J Submicrosc Cytol*, **11**, 85-89.

- Risueño, M.C. & Testillano, P.S. (1994). Cytochemistry and immunocytochemistry of nucleolar chromatin in plants. *Micron*, **25**, 331-360.
- Risueño, M.C., Testillano, P.S., & Sánchez-Pina, M.A. (1988). Variations of nucleolar ultrastructure in relation to transcriptional activity during G1, S and G2 periods of microspore interphase. In M. Cresti, P. Gori, & E. Pacini (Eds.), *Sexual reproduction in higher plants* (pp. 9-14). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rodríguez-García, M.I. & García, A. (1978). Differentiation of plastids population during microsporogenesis and development of the pollen grain in Liliaceae. *Biologie Cellulaire*, **33**, 63-70.
- Sanger, R. & Jackson, W.T. (1971). Fine structure study of pollen development in *Haemanthus katherinae* Baker. I. Formation of vegetative and generative cells. *J Cell Sci*, **80**, 289-301.
- Sangwan, R.S. & Camefort, H. (1983). The tonoplast, a specific marker of embryogenic microspores of *Datura* cultured in vitro. *Histochemistry*, **78**, 473-480.
- Santisteban, M.S. (1993). *Etude in situ de la relation structure-fonction de la chromatine par analyse d'images en fluorescence*. Tesis doctoral. Université Joseph Fourier. Grenoble.
- Sánchez-Pina, M.A. (1983). *Estudio de las proteínas argirófilas durante el ciclo nucleolar de las células reproductoras masculinas en liliáceas*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. :
- Shaw, P., Highett, M.I., Beven, A.F., & Jordan, E.G. (1995). The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J*, **14**, 2896-2906.
- Sheer, U. & Benavente, R. (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssay*, **12**, 14-21.
- Shi, L., Mogensen, H.L., Zhu, T., & Smith, S.E. (1991). Dynamics of nuclear pore density and distribution patterns within developing pollen: implications for a functional relationship between the vegetative nucleus and the generative cell. *J Cell Sci*, **99**, 115-120.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., & Chambonnet, D. (1979). Obtention de plantes haploïdes par androgenèse in vitro chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amélior Plantes*, **29**, 583-606.
- Sobczak-Thepot, J., Harper, F., Florentin, I., Zindy, F., Brechot, C., & Puvion, E. (1993). Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res*, **206**, 43-48.

- Sogo, J.M., Ness, P.J., Widmer, R.M., Parish, R.W., & Koller, T. (1984). Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol*, **178**, 897-928.
- Spiker, S. (1982). Histone variants in plants: evidence for primary structure variants differing in molecular weight. *J Biol Chem*, **257**, 14250-14255.
- Spiker, S. (1985). Plant chromatin structure. *Ann Rev Plant Physiol*, **36**, 235-253.
- Steffensen, D.M. (1966). Synthesis of ribosomal RNA during growth and division in *Lilium*. *Exp Cell Res*, **44**, 1-12.
- Steinbrecht, R.A. & Zierold, K. (1987). *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Berlin: Springer-Verlag.
- Stinson, J.R., Eisenberg, A.J., Willing, R.P., Pe, M.E., Hanson, D.D., & Mascarenhas, J.P. (1987). Genes expressed in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiol*, **83**, 442-447.
- Stoeckenius, W. (1961). Electron microscopy of DNA molecules stained with heavy metal salts. *J Biophys Biochem Cytol*, **11**, 297-310.
- Stöger, E., Benito-Moreno, R.M., Ylstra, B., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1992). Comparison of different techniques for gene transfer into mature and immature tobacco pollen. *Transgenic Research*, **1**, 71-78.
- Suzuka, I., Daidoji, H., Matsouka, M., Kadowari, K., Takasaki, Y., Nakane, P., & Moriuchi, T. (1989). Gene for proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 3189-3193.
- Suzuka, I., Hata, S., Matsouka, M., Kosugi, S., & Hashimoto, J. (1991). Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) gene in plants. *Eur J Biochem*, **195**, 571-575.
- Tandler, C.J. & Solari, A.J. (1982). Methanol-acetic anhydride: an efficient blocking agent for electron microscope cytochemistry. Its application to mouse testis and other tissues. *Histochemistry*, **76**, 351-361.
- Tanksley, S.D., Zamir, D., & Rick, C.M. (1981). Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Science*, **213**, 453-455.
- Telmer, C.A., Newcomb, W., & Simmonds, D.H. (1993). Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. *Protoplasma*, **172**, 154-165.
- Testillano, P.S. (1991). *Estudio citoquímico e inmunocitoquímico de la función nuclear durante la interfase postmeiótica del polen*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Fadón, B., & Risueño, M.C. (1995a). The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp Cell Res*, **221**, 41-54.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., & Risueño, M.C. (1995b). The methylation-acetylation (MA) method, an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. *J Struct Biol*, **114**, 123-139.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Fadón, B., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., & Risueño, M.C. (1993a). Immunolocalization of nuclear antigens and ultrastructural cytochemistry on tapetal cells of *Scilla peruviana* and *Capsicum annum*. *Pl Syst Evol*, suppl. **7**, 75-90.
- Testillano, P.S., Gorab, E., & Risueño, M.C. (1994). A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem*, **42**, 1-10.
- Testillano, P.S. & Risueño, M.C. (1988). Evolution of nuclear interchromatin structures during microspore interphase periods. In M. Cresti, P. Gori, & E. Pacini (Eds.), *Sexual reproduction in higher plants* (pp. 151-156). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., López-Iglesias, C., Olmedilla, A., Christensen, M.E., & Risueño, M.C. (1992). Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. *Chromosoma*, **102**, 41-49.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Fuchs, J.P., & Risueño, M.C. (1993b). Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain containing snRNPs in plant cells. A cytochemical and immunoelectron microscopy study. *Eur J Cell Biol*, **61**, 349-361.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.A., Tandler, C.J., & Risueño, M.C. (1991). A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem*, **39**, 1427-1438.
- Thiry, M. (1991). DNase I-sensitive sites within the nuclear architecture visualized by immunoelectron microscopy. *DNA and Cell Biology*, **10**, 169-180.
- Thiry, M. (1992a). New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6195-6200.
- Thiry, M. (1992b). Highly sensitive immunodetection of DNA on sections of exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non isotopic nucleotide analogues. *J Histochem Cytochem*, **40**, 411-419.
- Thiry, M. (1995a). The interchromatin granules. *Histol Histopathol*, **10**, 1035-1045.

- Thiry, M. (1995b). Ultrastructural detection of nucleic acids by immunocytochemistry. In G. Morel (Ed.), *Visualization of nucleic acids* (pp. 111-135). Boca Raton: CRC Press, Inc..
- Thiry, M. & Muller, S. (1989). Ultrastructural distribution of histones within Ehrlich tumour cell nucleoli: a cytochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem*, **37**, 853-862.
- Thiry, M., Scheer, U., & Goessens, G. (1991). Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and in situ hybridization at the electron microscopy level. *Electron Microsc Rev*, **4**, 85-110.
- Thompson, W.F. & Flavell, R.B. (1988). DNase I sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in wheat. *J Mol Biol*, **204**, 535-548.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., & Hurt, E.C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J*, **10**, 573-583.
- Touraev, A., Lezin, F., Heberle-Bors, E., & Vicente, O. (1995). Maintenance of gametophytic development after symmetrical division in tobacco microspore culture. *Sex Plant Reprod*, **8**, 70-76.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R.J.G., & Beato, M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J*, **14**, 1737-1751.
- Twell, D., Klein, T.M., Fromm, M.E., & McCormick, S. (1989). Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiol*, **91**, 1270-1274.
- Ueda, K. & Tanaka, I. (1995). Male gametic nucleus-specific H2B and H3 histones, designated gH2B and gH3, in *Lilium longiflorum*. *Planta*, **197**, 289-295.
- Vergne, P., Delvallee, I., & Dumas, C. (1987). Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Tech*, **72**, 299-304.
- Vicente, O., Benito-Moreno, R.M., & Heberle-Bors, E. (1991). Pollen cultures as a tool to study plant development. *Cell Biology Reviews*, **25**, 295-305.
- Vilaró, S. (1991). Fijación química en inmunocitoquímica: métodos y fundamentos. In M. Durfort, S. Vilaró, J. Renau, & J. Serratosa (Eds.), *Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica* (pp. 65-80). Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J.P., & Puvion, E. (1993). Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution in situ

- hybridization: revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells. *Eur J Cell Biol*, **60**, 308-321.
- Wagner, V.T., Cresti, M., Salvatici, P., & Tiezzi, A. (1990). Changes in volume, surface area, and frequency of nuclear pores of the vegetative nucleus of tobacco pollen in fresh, hydrated, and activated conditions. *Planta*, **181**, 304-309.
- Wansink, D.G., Schul, W., Van Der Kraan, I., Van Steensel, B., Van Driel, R., & De Jong, L. (1993). Fluorescent labelling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol*, **122**, 283-293.
- Wassef, M. (1979). A cytochemical study of interchromatin granules. *J Ultrastruct Res*, **69**, 121-133.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steiz, J.A., & Weiner, A.M. (1987). The functioning of higher eucaryotic genes. In J.R. Gillen (Ed.), *Molecular Biology of the Gene* (pp. 676-744). Menlo-Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Weintraub, H. & Groudine, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, **193**, 848-856.
- Weisbrod, S. (1982). Active chromatin. *Nature*, **297**, 289-295.
- Willing, R.P. & Mascarenhas, J.P. (1984). Analysis of the complexity and diversity of mRNAs from pollen and shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiol*, **75**, 865-868.
- Yasuzumi, G. & Sugihara, R. (1965). The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. *Exp Cell Res*, **37**, 207-229.
- Zaki, M.A.M. & Dickinson, H.G. (1990). Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, **156**, 149-162.
- Zaki, M.A.M. & Dickinson, H.G. (1991). Microspore derived embryos in *Brassica*: The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex Plant Reprod*, **4**, 48-55.
- Zarsky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schöffl, F., & Heberle-Bors, E. (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell and Environment*, **18**, 139-147.
- Zarsky, V., Garrido, D., Rihova, L., Tupy, J., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1992). Derepression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex Plant Reprod*, **5**, 189-194.

- Zobel, C.R. & Beer, M. (1961). Electron stains I. Chemical studies on the interaction of DNA with uranyl salts. *J Biophys Biochem Cytol*, **10**, 335-346.
- Zobel, C.R. & Beer, M. (1965). The use of heavy metal salt as electron stains. *Int Rev Cytol*, **18**, 363-400.