

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA CELULAR DE *Lacandonia schismatica* POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

ROGELIO JAIME FRAGOSO SORIANO

2859/14

MÉXICO, D. F. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA CELULAR DE *Lacandonia schismatica* POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

ROGELIO JAIME FRAGOSO SORIANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Caracterización de Materiales por Microscopía de Fuerza Atómica y Tunelamiento, del Departamento de Física del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.

DEDICATORIA

A mi familia.

**Silvia, Ulises y Tania Lizbeth.
Que son el motivo esencial
en todos mis proyectos, por su
cariño y comprensión.**

A mis padres.

**Luciano y Esther.
Que me han apoyado con
su cariño y bondad en todas
mis metas emprendidas.**

A mis hermanos.

**Sergio, Francisco, Guillermo y Efraín.
Por ser simplemente ellos: mis hermanos.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la dirección y apoyo del presente estudio y la cuidadosa revisión del manuscrito.

Al Dr. Ciro Falcony Guajardo por las facilidades y apoyo para la realización de este trabajo y en general para los estudios de la maestría, así como al Dr. Carlos Vázquez López por su amistad incondicional y apoyo durante la realización del presente trabajo y por formar parte ambos del comité de sinodales.

A los miembros del jurado: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla, Dra. Maria de Lourdes Segura Valdez y M. en C. Lourdes Teresa Agredano Moreno por la revisión del trabajo de tesis.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)

A la Universidad Nacional Autónoma de México donde me he formado académica y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACyT) por su apoyo para la realización de mis estudios de maestría. (Becario # 113158)

Al CONACyT, proyecto 28002-N.

Al Instituto de Biología por la información proporcionada a través de su biblioteca, sobre *Lacandonia schismatica*.

Al Biól. Esteban Martínez y a la M. en C. Clara H. Ramos por el material proporcionado que fue objeto de este estudio.

A la M. en C. Lourdes Agredano M. Por su valiosa ayuda en la preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Al Ing. Zacarias Rivera A. Por su asesoría y apoyo en el manejo de software, en la realización del manuscrito.

A todos, los que de alguna manera me ayudaron y apoyaron en la realización del presente trabajo, mi más sincero y afectuoso agradecimiento.

| | |
|--|----|
| I. Resumen..... | 1 |
| II. Justificación..... | 2 |
| III. Introducción..... | 3 |
| 1. Diversidad Biológica..... | 3 |
| 1.2 Tipos de Diversidad Biológica..... | 3 |
| 2. Descripción Botánica de <i>Lacandonia schismatica</i> | 7 |
| 2.1 Descripción y Clave de la Familia..... | 7 |
| 2.1.1 Descripción de la Familia por E. Martínez S..... | 7 |
| 2.2 Descripción y Clave del Grupo Mayor..... | 7 |
| 2.3 Hábitat..... | 7 |
| 3. Estudios sobre la Biología de <i>Lacandonia schismatica</i> | 12 |
| 4. <i>Ginkgo biloba</i> | 15 |
| 5. Microscopía de Fuerza Atómica y Tunelamiento..... | 16 |
| 5.1 Microscopía de Barrido por Tunelamiento..... | 16 |
| 5.1.1 Efecto Túnel..... | 22 |
| 5.2 Microscopía de Fuerza Atómica..... | 24 |
| 5.2.1 Sistema de Control del AFM..... | 25 |
| 5.2.2 Estructura del AFM..... | 28 |
| 5.2.3 Modos de Operación del AFM..... | 31 |
| 5.2.3.1 Modo de Contacto..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 5.2.3.2 Modo de No Contacto..... | 35 |
| 5.2.3.3 Modo de Contacto Intermitente en AFM..... | 36 |
| IV. Objetivos..... | 39 |
| V. Materiales y Métodos..... | 40 |
| a) Microscopía Electrónica de Transmisión | 40 |
| b) Microscopía de Fuerza Atómica..... | 40 |
| Diagrama de Flujo No.1 TEM | 41 |
| Diagrama de Flujo No.2 AFM..... | 42 |
| VI. Resultados | 44 |
| VII. Discusión | 55 |
| VIII. Conclusiones | 58 |
| IX. Referencias..... | 59 |

I. RESUMEN

Lacandonia schismática es la única planta con flores con los órganos reproductores espacialmente invertidos. Se han realizado varios estudios para entender mejor su biología. Investigaciones previas sobre el núcleo y citoplasma de esta especie, se han llevado a cabo usando microscopía electrónica de transmisión. El núcleo celular es reticulado con abundantes partículas ribonucleoproteicas con diámetros de 32 nm. En el citoplasma se observan plástidos, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi.

El objetivo de este trabajo fue conocer la posibilidad de estudiar la estructura celular de *L. schismatica* por medio de la microscopía de fuerza atómica. Muestras de *Lacandonia schismatica* fueron preparadas para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes semifinos fueron montados sobre portaobjetos y analizados con un microscopio de fuerza atómica trabajando con actuadores piezoeléctricos de barrido máximo de 100 y 10 μm , operando en condiciones ambientales, en el modo de contacto, con una fuerza de contacto en el rango de 1 a 100 nN, a una frecuencia de barrido de entre 1 y 2 Hertz y una ganancia de 0.3-0.5 unidades arbitrarias.

Los contornos de las paredes celulares de cada célula aparecen bien definidos. Las vacuolas fueron vistas como espacios grandes en la célula. Los núcleos celulares fueron observados como estructuras grandes y redondeadas. Un patrón reticulado para la cromatina fue similar al observado por TEM. Uno o dos nucléolos fueron también observados. En el citoplasma se pudieron detectar mitocondrias y plástidos. Para comparar, también se observó la estructura celular de *Ginkgo biloba*, donde los cloroplastos fueron abundantes y se detectó almidón. *Lacandonia schismatica* no tiene cloroplastos debido a su hábitat saprófito. Los resultados indican que la estructura celular de las plantas puede ser analizada con microscopía de fuerza atómica en cortes semifinos de material preparado para microscopía electrónica de transmisión.

II. JUSTIFICACION

Debido a que a la fecha es poco el avance en cuanto a observaciones de estructuras celulares “*in situ*” –es decir, en el tejido- con microscopía de fuerza atómica (AFM), en esta tesis se pretende abordar el campo en esta área y conocer más acerca de la estructura celular de *Lacandonia schismatica*, que es una especie vegetal de gran importancia biológica, que se caracteriza por la posición invertida de sus órganos masculinos (androceo) y femeninos (gineceo), una característica nunca antes vista en otras angiospermas.

El uso de herramientas novedosas en el estudio de la organización celular y tisular, nos permitirá generar una visión más integrada de los fenómenos biológicos. Por ello, la justificación de la presente tesis radica en determinar si el AFM pudiera ser una herramienta de uso rutinario para el estudio de la estructura celular de plantas.

El requerimiento mínimo para la observación con el AFM es que la muestra debe tener una superficie lo más plana posible, puesto que este instrumento puede detectar rugosidades topográficas que van desde algunos ángstroms hasta 2.5 μm . En muestras biológicas, esa propiedad se puede lograr utilizando el procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM), debido a que los cortes generados con cuchillas de vidrio o diamante producen muestras lisas y duras. Un corte obtenido en las mejores condiciones de ultramicrotomía, puede entonces ser observado con AFM y las imágenes pueden interpretarse y correlacionarse con los resultados que se han logrado en estudios anteriores sobre *L. schismatica* con TEM.

III. INTRODUCCIÓN

1. Diversidad Biológica

La biodiversidad es un resultado del proceso evolutivo que se manifiesta en la existencia de distintos modos de ser para la vida. Mutación y selección determinan las características y la cantidad de diversidad que existen en un lugar y momento dados. Diferencias a nivel genético, cambios en las respuestas morfológicas, fisiológicas y etológicas de los fenotipos, modificaciones en las formas de desarrollo, en la demografía, y en las historias de vida. La diversidad biológica abarca toda la escala de organización de los seres vivos. Sin embargo, cuando nos referimos a ella en un contexto conservacionista, estamos hablando de diversidad de especies, de variación intra específica e intrapoblacional, y en última instancia de variación genética, que no por estar enmascarada a veces por fenómenos de dominancia deja de ser lábil y expuesta a la desaparición (Solbrig, 1991). Para este autor, la diversidad biológica o biodiversidad es la propiedad de las distintas entidades vivas de ser variadas. Así, cada clase de entidad llamada gen, célula, individuo, comunidad o ecosistema tiene más de una manifestación. La diversidad es una característica fundamental de todos los sistemas biológicos, que se manifiesta en todos los niveles jerárquicos, desde las moléculas hasta los ecosistemas.

En un sentido estricto, la diversidad como un concepto derivado de la teoría de sistemas es simplemente una medida de la heterogeneidad de un sistema. En el caso de los sistemas biológicos, la diversidad se refiere a la heterogeneidad biológica, es decir, a la cantidad y proporción de los diferentes elementos biológicos que contenga el sistema. La medida o estimación de la biodiversidad depende, entre otras cosas, de la escala a la cual se defina el problema.

1.2 Tipos de Diversidad Biológica

En un contexto biogeográfico, la biodiversidad se mide cuantificando la heterogeneidad biogeográfica en una zona o región dada. La biodiversidad geográfica está dada por la diversidad de ecosistemas en una región determinada. A nivel ecológico, la biodiversidad tiene dos expresiones bien definidas en el análisis de comunidades: la diversidad presente en un sitio y la heterogeneidad espacial. La diversidad es una función de la cantidad de especies presentes en un mismo hábitat, y es el componente de la diversidad más importante (y más comúnmente citado) de las selvas tropicales

húmedas y de los arrecifes coralinos, por sólo dar dos de los ejemplos más conocidos (Halffter, 1991).

Finalmente, existe un componente genético o intra específico de la heterogeneidad biológica. En el ámbito de una sola especie, puede existir mucha o poca variabilidad genética, dada por la cantidad de alelos diferentes que tenga la especie (variabilidad genotípica), y los caracteres que estos diferentes alelos codifiquen en el organismo (variabilidad fenotípica). La diversidad genética depende de la historia evolutiva de la especie, del nivel de endocría de la población, de su aislamiento reproductivo, y de la selección natural a favor o en contra de la heterosis, entre otras varias causas. La diversidad genética, conocida también como variación, es un componente importantísimo de la biodiversidad. La trascendencia de la variación genética es bien conocida en el caso de las plantas cultivadas y de los animales domésticos, donde se realizan desde hace muchas décadas grandes esfuerzos para conservar la diversidad del germoplasma original, sobre la cual operan los procesos de selección genética que realizan los criadores de razas y variedades. Sin variación genética, la transformación de la especie a través de la selección no es posible. Este nivel de la biodiversidad es también de gran importancia en las poblaciones silvestres, para las cuales supervivencia y adaptación están frecuentemente condicionadas al mantenimiento de un número poblacional mínimo que asegure un cierto nivel de exocría y heterosis. Por debajo de este número las poblaciones se ven con frecuencia amenazadas con la extinción, sencillamente porque no pueden adaptarse por medio de la selección natural a los cambios que ocurren en su medio.

Estos tres niveles de la biodiversidad (el genético, el ecológico y el biogeográfico) han sido reconocidos, con diferentes nombres por distintos autores. En particular, por su sencillez y claridad, seguimos el esquema de Rabinowitz *et al.* (1986).

La biodiversidad no depende sólo de la riqueza de especies, sino también de la dominancia relativa de cada una de ellas. Las especies, en general, se distribuyen según jerarquías de abundancias, desde algunas especies muy abundantes hasta algunas muy raras. Cuanto mayor el grado de dominancia de algunas especies y de rareza de las demás, menor es la biodiversidad de la comunidad. Esto es muy común, por ejemplo, en algunos tipos de vegetación templada como los bosques de pinos, donde hasta el 90% de la biomasa del ecosistema está formada por sólo una o dos especies, y el 10% restante por una cantidad grande de plantas de baja abundancia.

manantiales y el bombeo de agua para riego está destruyendo muy rápidamente su hábitat en todo el desierto, y está poniendo a la especie en peligro de extinción.

c) Rareza demográfica. Finalmente, hay especies que son demográficamente raras, es decir, que presentan densidades bajas en toda el área de distribución, aunque ésta sea amplia y aunque no estén asociadas a hábitat muy específicos. Un ejemplo notable de este nivel de rareza ecológica es la cola de zorra (*Setaria geniculata*), una gramínea que se encuentra a lo largo de todo el continente americano, desde California hasta la Patagonia, pero que no crece en densidades altas en ninguna parte (May, 1989). La rareza de esta especie no radica ni en su distribución biogeográfica ni en su preferencia de hábitat, que son ambas amplias, sino en el hecho de que sus poblaciones son crónicamente "ralas", y que en ninguna parte llega a ser un componente importante de la comunidad.

Por supuesto, los casos más críticos de rareza son los de aquellas especies que reúnen las tres características: son endémicas a nivel biogeográfico, son muy estenoecas en su preferencia de hábitat, y presentan poblaciones en números bajos. Uno de los casos más notables de este grupo es una especie de planta sin clorofila descubierta hace 15 años y dada a conocer 4 años después por Esteban Martínez en la Selva Lacandona, Chiapas, México (Martínez y Ramos, 1989). *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae) reúne el dudoso privilegio de crecer en un área de aproximadamente una hectárea (rareza biogeográfica), asociada a suelos de turberas tropicales (rareza del hábitat), con una bajísima variación genética y en números relativamente bajos (rareza demográfica). Es por supuesto, una de las especies más raras que se conocen (Diario Oficial de la Federación, 1994).

Lacandonia schismatica se encuentra dentro de las llamadas áreas naturales protegidas (ANP), que constituyen porciones terrestres o acuáticas del territorio nacional, representativas de los diferentes ecosistemas y de su biodiversidad, en donde el ambiente original no ha sido esencialmente alterado por el hombre y que están sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo.

Considerando la importancia de conservar las especies y organismos vivos de nuestro gran hábitat, en el presente trabajo se trata de contribuir con un estudio adicional sobre *Lacandonia schismatica*, porque solo conociendo su biología y estructura se estará en las mejores condiciones de hacer un manejo adecuado de ella.

2. Descripción Botánica de *Lacandonia schismática* (Martínez y Ramos, 1989)

Lacandonia E. Martínez y C.H. Ramos

Hierbas afilas, hialinas. Rizoma horizontal de crecimiento indefinido; raíces fibrosas, esparcidamente pelosas. Tallos aéreos simples, glabros. Inflorescencia simpodial; pedicelos ascendentes. Flores con (4-6) tépalos, densamente papilosos, cada uno con una cauda lineal en el ápice. Gineceo con 60-80 pistilos papilosos de maduración centripeta; estilo subapical. Estambres (2-3)(-4), centrales, insertados en el borde de la depresión del receptáculo; anteras 2-loculares, con 2(-3) lóbulos; polen intectado, inaperturado, verrugoso. Fruto agregado, poliaquenio. Semillas elipsoides, reticuladas, engrosadas distalmente y con una corta proyección basal. 1 sp. Chiapas.

2.1. Descripción y clave de la familia

La única especie es *Lacandonia schismatica*.

Flora Mesoamericana - 16 Mar 1999

242. LACANDONIACEAE

2.1.1. Descripción de la familia por E. Martínez S.

Hierbas micrótrofas, rizomatosas. Inflorescencia racemosa, bracteada. Flores bisexuales, en ocasiones pistiladas; gineceo y androceo sobre un receptáculo. Gineceo apocárpico con los carpelos rodeando al androceo. Carpelos 1-loculares, con 1 óvulo de placentación basal, anátropo, bitegumentado. Estambres centrales marcescentes; anteras con suturas longitudinales introrsas pero sin dehiscencia. Semillas con embrión indiferenciado y endospermo abundante. 1 gen. Chiapas.

2.2. Descripción y clave del Grupo Mayor

Esta es una familia monotípica basada en *Lacandonia schismatica*. Es conocida sólo en dos localidades en la Selva Lacandona del este de Chiapas.

2.3. Hábitat

El primer registro se encuentra en la selva alta subperennifolia con abundancia en *Calophyllum brasiliense* Camb. *Terminalia amazonia* (J.Gmelin) y *Cryosophyla argentea* Bartlett. Las

condiciones ambientales sobre los substratos de materia orgánica son muy húmedas, pero no inundados, con demasiada sombra y poca oscilación de temperatura. Esta región se encuentra en México. Chiapas: Mpio. Ocosingo, cruceo Corozal, 170 Km al SE de Palenque, camino a Boca Lacantum, sobre la carretera fronteriza del sur ($15^{\circ} 45' 08''$ N $90^{\circ} 56' 00''$) (Martínez y Ramos, 1989).

La otra localidad fue reportada en 1995 (Reyes-García y Sousa, 1995) para la familia Lacandoniaceae como resultado de las colecciones botánicas en un proyecto multidisciplinario realizado por los autores. Este nuevo registro se localiza dentro de la Reserva Montes Azules, cerca de la colonia Benito Juárez Miramar ($16^{\circ} 12'$ N y $91^{\circ} 13'$ O). Por lo tanto, se amplió la distribución de esta especie y se deshecha la idea de que tenía una distribución limitada a la localidad tipo.

En esta nueva localidad (aproximadamente una hectárea), los tipos de vegetación que se observaron son el de selva alta perennifolia, selvas mediana y baja subperennifolias. La composición florística en cada una de ellas es variable, pero con frecuencia se encuentran en mayor o menor medida las mismas especies (Fig.1).

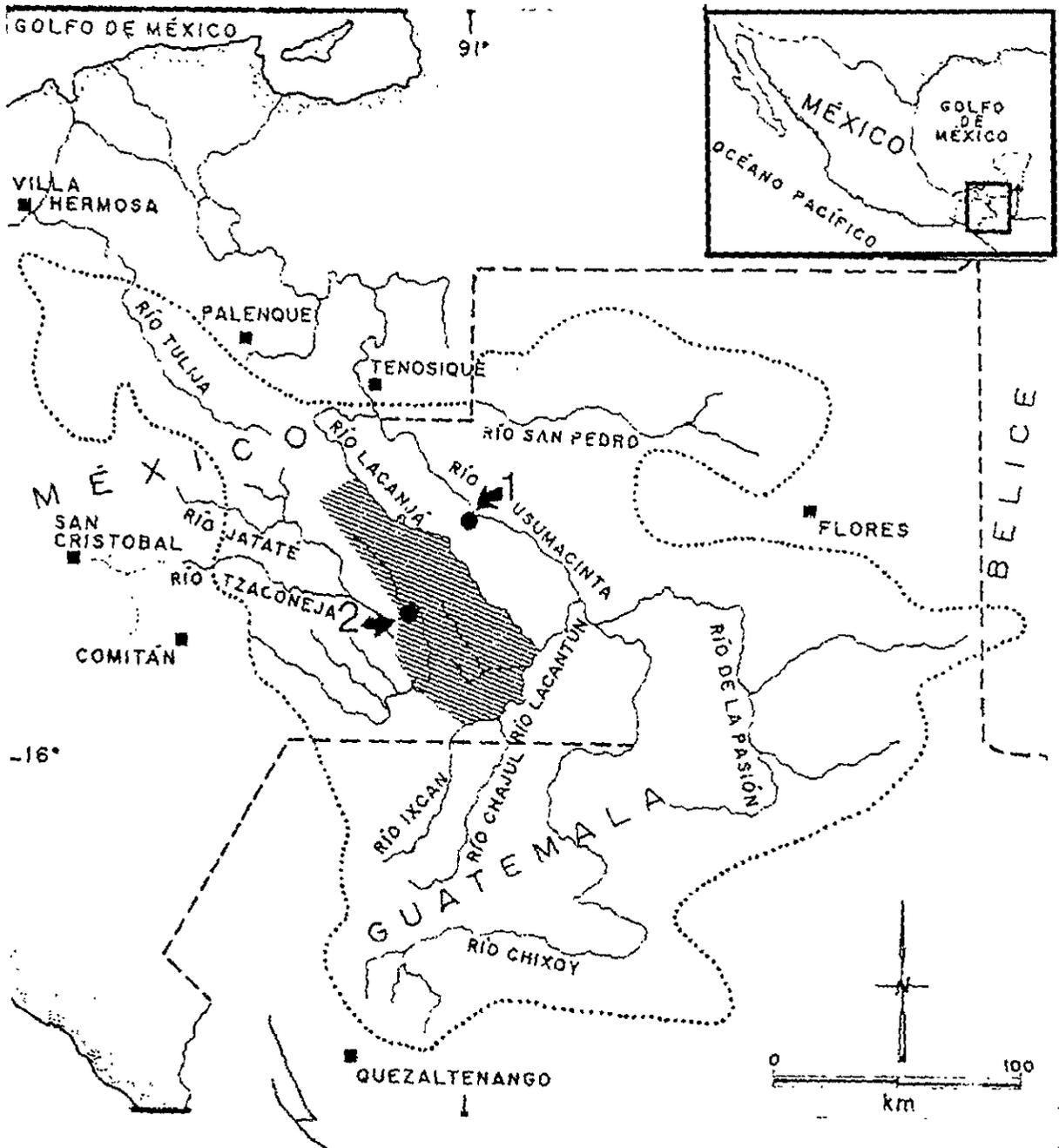


Fig.1 Registro de localización de *Lacandonia schismatica*
(Tomado de Reyes-García y Sousa, 1995)

La nueva familia Lacandoniaceae ha sido ubicada taxonómicamente en el orden Triuridales junto a las familias Petrosaviaceae Hutchinson y Triuridaceae Garner (Cronquist, 1981).

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia: Lacandoniaceae

Género: *Lacandonia*

Especie: *schismatica*

La relación espacial que presentan los órganos reproductores es difícil de explicar a la luz de los conocimientos actuales. El nombre genérico está dedicado a la región Lacandona, asiento del pueblo lacandón, en el estado de Chiapas, México. El epíteto específico se refiere a los problemas que origina su morfología sistemática (Martínez y Ramos, 1989).

Lacandonia schismatica es una saprófita especializada. Las flores perfectas son producidas en sus retoños etéreos. El gineceo consiste de 60-80 carpelos papilosos. Cada carpelo rodea a un óvulo sésil basal que es aneutrópico y bitégmico. El integumento interno forma el micrópilo. El androceo consiste de tres o algunas veces 4 anteras biloculares con dehiscencia introrsa. Los granos de polen maduros contienen 3 células (Márquez-Guzmán *et. al.*, 1989; Martínez y Ramos, 1989) (Fig.2).

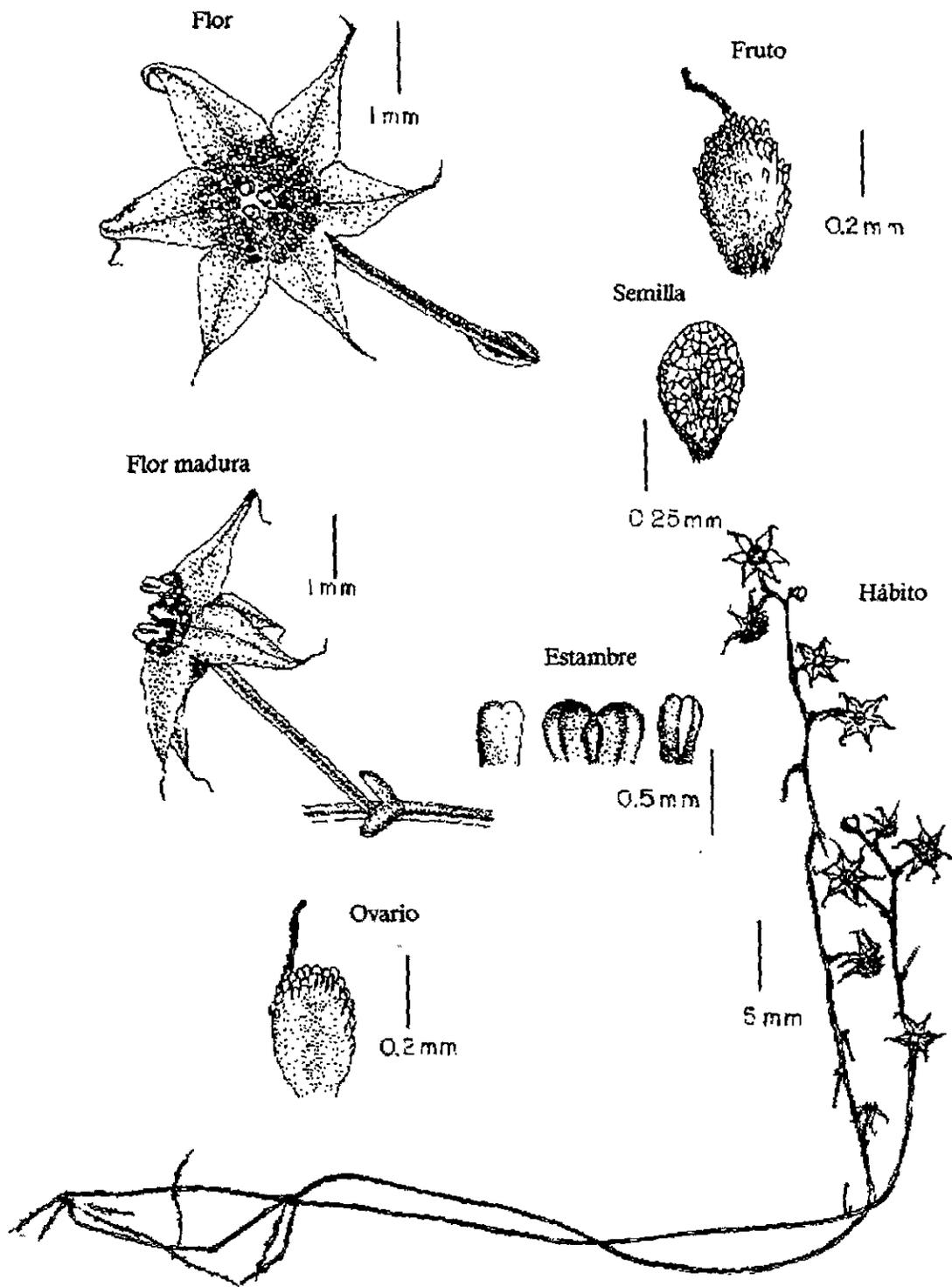


Fig.2 Estructuras principales de *Lacandonia schismatica* (Tomado de Martínez y Ramos, 1989).

3. Estudios sobre la Biología de *Lacandonia schismatica*.

Se han realizado diversos estudios sobre la biología y anatomía de *Lacandonia schismatica*. Uno de ellos es el realizado por Márquez-Guzmán *et al.* en 1989.

Ellos realizaron una descripción completa de las estructuras reproductoras de la planta tal y como se mencionó líneas arriba y concluyeron que estas características son semejantes a las descritas por Tomlinson (1982) y Maas y Rübshagen (1986).

Davidse y Martínez en 1990 reportaron que *Lacandonia schismatica* tiene un número cromosómico de $n=9$, que fue determinado en numerosas células madres de polen en estado de diacinesis, metafase I y anafase I y II. El tamaño de los cromosomas varía de 4.6-12.0 μm cuando son medidas en forma bivalente en metafase temprana I. El complemento cromosómico está fuertemente caracterizado por cuatro pares largos de cromosomas (8.3-12.0 μm) y cinco pares cortos de 4.6-6.4 μm . Los cromosomas heteromórficos de *Lacandonia schismatica* conforman el tipo de cariotipo que es ya conocido de Triuridaceae. Su población es estable y reproductivamente funcional, los frutos normales son desarrollados y su reproducción es por semillas aunque su germinación no ha sido observada y concluyeron que debido al interés intrínseco de esta planta, que se desarrolla en una área muy pequeña y que esta bajo amenaza fuerte de conversión a campo de forraje para ganado y porque es muy difícil de cultivar es especialmente urgente que su biología sea estudiada mientras las plantas vivientes existan (Davidse y Martínez, 1990).

En otro trabajo publicado por Coello *et al.* (1993), encontraron que en el caso de *Lacandonia*, la falta de variación genética puede ser explicada por un sistema de fertilización de autogamia, que fue reportada por Márquez-Guzmán *et al.* (1993)

Puesto que *Lacandonia* se restringe al parecer a un área pequeña, no puede rechazarse la existencia de varias subpoblaciones en este momento. El tamaño pequeño de la planta, su localización bajo la hojarasca y su sistema de polinización por cleistogamia sugieren muy bajos niveles de flujo genético y puede dar lugar a varias subpoblaciones dentro de un área pequeña. Las muestras usadas en este estudio fueron colectadas en el mismo sitio y esto sugiere que otras subpoblaciones podrían tener la misma baja variación genética, pero con diferentes juegos de alelos.

La baja variación genética tiene implicaciones contradictorias para la conservación de la planta, puesto que es difícil preservar la planta en condiciones de vida, lo que se debe a la muerte de los hongos de la raíz asociados. Es probable que las condiciones microambientales cambien y este puede ser el caso de que la *Lacandonia schismatica* no tenga variabilidad genética para adaptarse a una nueva situación. Estos autores concluyen que se necesita hacer el esfuerzo para mantener la planta en condiciones de laboratorio para así conocer y entender los requerimientos ecológicos y estructura genética con el objeto de proponer estrategias de permanencia (Coello *et al.*, 1993).

En 1993, Palacios Mayorga y Pérez Silva estudiaron la micorriza endotrófica de *Lacandonia* y encontraron la formación de ovillos intracelulares (constituidos por hifas arrosariadas) que permite establecer cierta similitud con la micorriza de las orquídeas. Sin embargo, el diámetro de las hifas y la ausencia de septos hifales, así como el desarrollo de vesículas sugieren una semejanza con la micorriza vesicularbuscular. No obstante, el hecho de haberse observado arbuscúlos hace pensar en una variante o forma típica. Finalmente, al comparar la micorriza de *L. schismatica* con la de *Triuris brevistylis* (Triuridaceae J. B. Swith), ambas de áreas vecinas, se encontró una gran similitud entre ellas (Palacios-Mayorga y Pérez-Silva, 1993).

Jiménez-García *et al.* (1992) realizaron un estudio del núcleo celular interfásico de *Lacandonia*, en el cual el principal objetivo fue el de caracterizar el patrón general de este organelo y compararlo con especies relacionadas, como *Triuris alata* Brade (Triuridaceae:Triuridales) por citoquímica en microscopía electrónica. Investigaciones posteriores demostraron que *T. alata* corresponde al género *T. brevistylis* (Gómez y Martínez, 1994). Los resultados de aquel trabajo indicaron que el núcleo en interfase de *L. schismatica* y *T. alata* son del tipo reticulado. Una lamina está presente en estas especies. Racimos grandes de gránulos de cerca de 30 nm de diámetro ocupan el espacio intercromatiniano y pericromatiniano en ambas especies. Fibras pericromatinianas son raramente observadas en este núcleo. Los típicos gránulos intercromatinianos no fueron encontrados. Los nucléolos son compactos y se observan cuerpos asociados al nucléolo. Ocasionalmente los centrómeros aparecen a lo largo de la cromatina reticulada compacta. Estructuras anulares y complejos parecidos a sinaptonemas fueron observadas en ambas especies. A los gránulos de 30 nm los autores los llamaron gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García *et al.*, 1992), los cuales no corresponden por su abundancia y tamaño a los llamados gránulos intercromatinianos descritos en plantas por Medina *et al.* (1989). El tamaño de los gránulos es intermedio entre gránulos

intercromatinianos y pericromatinianos. Estos gránulos fueron estudiados por Agredano-Moreno (1991, 1993) y Agredano-Moreno *et al.* (1994) encontrando que estas estructuras son ribonucleoproteínas o RNP por sus siglas y son partículas involucradas en la transcripción del RNA y su procesamiento.

Frecuentemente un pequeño grupo de gránulos de *Lacandonia* aparece en la punta de un filamento cuyas ramas de un filamento central son parecidas a una unidad de transcripción. Los autores además demostraron características estructurales y citoquímicas similares entre los gránulos de *Lacandonia*, gránulos pericromatinianos y los gránulos de los anillos de Balbiani. Otro dato relevante de este trabajo es que los gránulos de *Lacandonia* son relativamente insensibles a la enzima RNAsa, pero muchos de ellos desaparecen o llegan a deformarse cuando con tratamientos cortos de pronasa son aplicados después de la extracción con RNAsa. Los gránulos pericromatinianos y los de los anillos de Balbiani reaccionan similarmente con estos tratamientos. Sin embargo, una tinción discontinua puede ser vista en la periferia de algunos gránulos de *Lacandonia*. Esta tinción puede estar relacionada con la presencia de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares ricas en uracilo (UsnRNPs) detectados por inmunocitoquímica en la periferia de un pequeño número de gránulos de *Lacandonia*. La ausencia de UsnRNPs en muchos gránulos de *Lacandonia* así como su presencia en la periferia de unos pocos de ellos corresponden con la distribución de estas proteínas encontradas en los gránulos de anillos de Balbiani del núcleo con cromosomas politénicos. Los UsnRNPs están presentes sólo en gránulos de anillos de Balbiani inmaduros los cuales están en formación en las regiones activas de transcripción, pero esto no es visto en los gránulos nucleoplásmicos. El marcado de los gránulos de *Lacandonia* probablemente corresponde también a estructuras en el proceso de formación (Agredano-Moreno *et al.*, 1994).

Vázquez-Santana *et al.* (1998) realizaron un estudio donde describen el desarrollo de la semilla y el óvulo de *Lacandonia schismatica*. El óvulo en cada carpelo es basal anatópico y bitegmico. El gametofito hembra está formado por la célula de la megaspóra micropila, después de una fase conocítica de los cuatro núcleos de la megaspóra. El gametofito hembra maduro tiene el complemento normal de siete células y ocho núcleos

Los autores proponen un tipo nuevo de desarrollo del gametofito hembra sobre la base de la fase cenocítico de la tétrada, la celularización de la tétrada y la sobrevivencia del micrópilo de la espóra. En el momento de la dispersión de la semilla, el embrión tiene de 10 a 20 células. El desarrollo del

endospermo es del tipo nuclear. En la madurez las células del endospermo muestran almidón e inclusiones proteicas así como polisacáridos en su pared espesa. La cubierta de la semilla está formada del integumento externo; la interna desaparece. La exotesta contiene taninos. La pared del fruto tiene dos capas y la maduración de los frutos en la flor es sincrónica y se separan del receptáculo para dispersión. Los resultados de este estudio muestran una porción de algunas características con la familia Triuridaceae de *Lacandonia schismatica* y difiere en otros rasgos embriológicos. Caracteres tales como la posición central de las anteras, la fertilización preantesis cleistogámica y el tipo de desarrollo del gametofito hembra apoyan el mantener a *L. schismatica* en una familia separada (Vázquez-Santana et al., 1998).

Jiménez-García et al. (1998), describen la ultraestructura del citoplasma de *Lacandonia schismatica* y su actividad fotosintética así como la estructura celular utilizando microscopía de fuerza atómica, que es parte de este trabajo en el que se observó que el aparato de Golgi es pequeño y las mitocondrias, los plastos que no registran actividad fotosintética, ribosomas y retículo endoplásmico, son similares a los de otras especies de plantas, lo que indica que la secreción celular incluyendo la formación de la pared celular, la respiración aerobia y la síntesis de proteínas de secreción, son funciones normales en *L. schismatica*, llevándose a cabo estas funciones en regiones celulares muy pequeñas. En cuanto a los resultados derivados de este trabajo, los autores mencionan la ventaja del uso de la técnica de microscopía de fuerza atómica en la que existe la posibilidad de observar estructuras celulares con resolución molecular.

4. *Ginkgo biloba*

G. biloba es la especie de árbol más antigua que se conoce. Los registros fósiles indican que esta planta ha crecido sobre la Tierra durante 150 a 200 millones de años, por lo que representa una especie vegetal con importancia evolutiva. Por ello, es una especie muy estudiada, de la cual se conoce mucho su ultraestructura celular (), lo que la hace adecuada para estudios comparativos.

5. Microscopía de Fuerza Atómica y Tunelamiento

5.1. Microscopía de Barrido por Tunelamiento

En 1870 Ernest Abbe con su teoría de difracción de imágenes dió los límites de resolución teóricos para el microscopio óptico y demostró que este era inadecuado para estudiar la estructura fina celular (Bustamante y Keller, 1995).

El progreso ocurrido en 1930, cuando el microscopio electrónico de transmisión (TEM) fue construido por Ernest Ruska, amplió la resolución a escala nanométrica, lo cual hizo posible la descripción ultraestructural de la arquitectura celular (Bustamante y Keller, 1995).

Pero no obstante sus limitaciones, el microscopio óptico es esencial para la investigación biológica, porque éste puede dar imágenes de muestras en agua, lo que permite observar procesos biológicos con características reales.

Por muchos años los investigadores se han esforzado en combinar la alta resolución proporcionada por el microscopio electrónico, con la capacidad de operación en medio acuoso del microscopio óptico (Bustamante y Keller, 1995). El invento del microscopio de barrido por tunelamiento mejor conocido por sus iniciales como STM por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en 1981 y el microscopio de fuerza atómica (AFM) por Binnig y Quate en 1986, abrió una nueva aproximación de llevar a cabo esta meta. El STM fue el primer miembro de una nueva clase de instrumentos llamados scanning probe microscopes (microscopio de barrido por sonda) los cuales están todos basados en principios similares (Binnig *et al.*, 1986).

Los microscopios de exploración de punta de prueba (SPMs) son una familia de instrumentos usados para estudiar las características superficiales de materiales desde el nivel de micrones hasta el nivel atómico. Todos los SPMs contienen los componentes ilustrados en el siguiente diagrama. (Fig. 3) (ThermoMicroscopes, 2000)

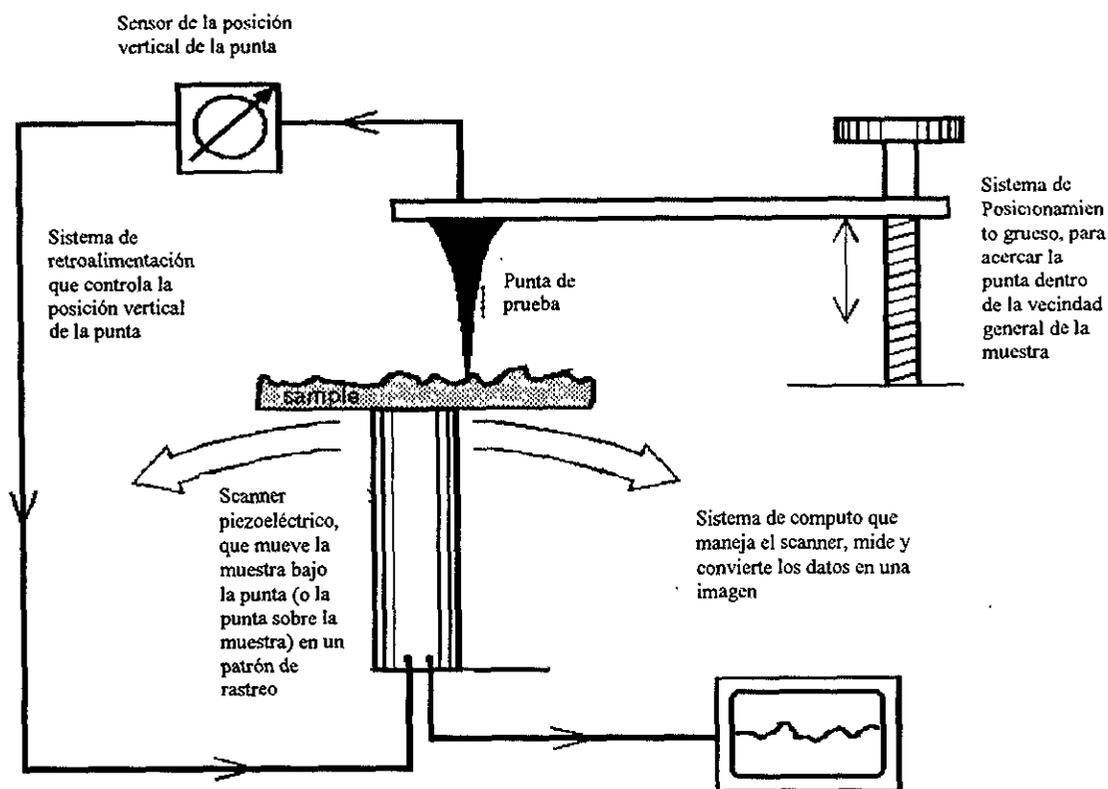


Fig.3 Diagrama esquemático de un SPM generalizado. (Tomado de www.Park.com)

En general, los componentes de los microscopios de barrido por sonda son una computadora, una unidad de control electrónico y un microscopio. La computadora es requerida para el control del instrumento, despliegue y análisis de imágenes. La unidad de control electrónico genera las señales que controlan los cerámicos piezoeléctricos en la estación, los cuales manejan los movimientos de la sonda o punta de prueba. Los SPM más avanzados tienen un microscopio óptico compatible, un módulo con arquitectura abierta de traductores automatizados X,Y y software avanzado. Aunque la estructura del instrumento parece elegantemente simple, hay una sofisticación considerable en la estación y software (Baldeschwieler *et al.*, 1991).

En 1986 Binnig y Rohrer recibieron el premio Nóbel en Física junto con Ernst Ruska, quien desarrolló el microscopio electrónico. Desde entonces la comunidad científica empezó a notar la importancia de este nuevo microscopio (Valenzuela-Benavides, 1998).

En STM, un voltaje es aplicado entre una punta de metal afilada y una muestra conductora a ser investigada. Después de llevar la punta y superficie de la muestra dentro de una separación de sólo unas unidades de \AA , una corriente de tunelaje puede fluir debido a las propiedades ondulatorias de los electrones descritas por la mecánica cuántica, como se observa en la Fig.4

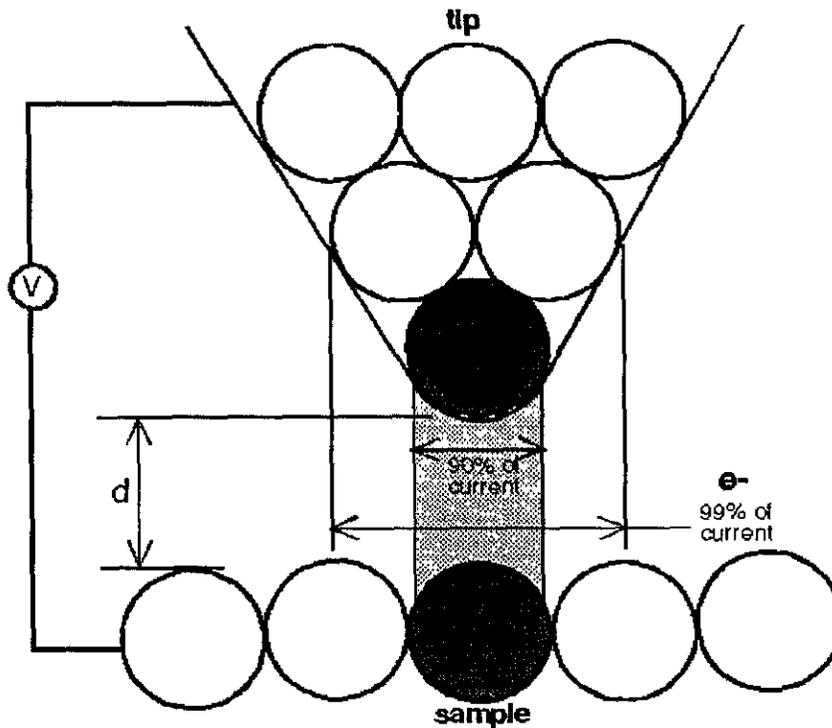


Fig.4 Esquema de la interacción de la punta y la muestra.

La corriente de tunelaje puede usarse para sondear propiedades físicas locales de la superficie de la muestra, así como para controlar la separación entre la punta y la superficie de la muestra (Valenzuela-Benavides, 1998).

El control de la distancia basado en el tunelaje es muy sensible a los cambios pequeños en la separación entre los dos electrodos, porque la corriente de tunelaje es fuertemente (exponencial) dependiente en esta separación. Una disminución en la separación de aproximadamente 1\AA aumenta la corriente de tunelaje un factor de 10 (Valenzuela-Benavides, 1998).

La tecnología de los materiales piezoeléctricos permitió el movimiento controlado de la muestra con respecto a la punta. En modo de altura constante, el actuador piezoeléctrico transporta la muestra en un patrón de barrido horizontal, y la corriente de túnelaje varía dependiendo de la

topografía y de las características electrónicas superficiales locales de la muestra. La corriente de túneleo medida en cada localización en la superficie de la muestra constituye los datos de la imagen topográfica.

En modo de corriente constante, los STMs usan un control de retroalimentación para mantener la corriente de túneleo constante por medio del ajuste de la altura del actuador piezoeléctrico en cada punto medido. Por ejemplo, cuando el sistema detecta un aumento en la corriente de túneleo, aparece un voltaje aplicado al actuador para aumentar la distancia entre la punta y la muestra. En modo de corriente constante, el movimiento vertical del actuador constituye los datos. (ThermoMicroscopes, 2000).

Cada modo tiene sus ventajas y desventajas. El modo de la altura constante es más rápido, porque el sistema no tiene que mover la muestra hacia arriba y hacia abajo, y proporciona información útil únicamente para las superficies relativamente lisas. El modo de corriente constante puede medir superficies irregulares con la más alta precisión, pero las mediciones toman más tiempo (Fig.5).

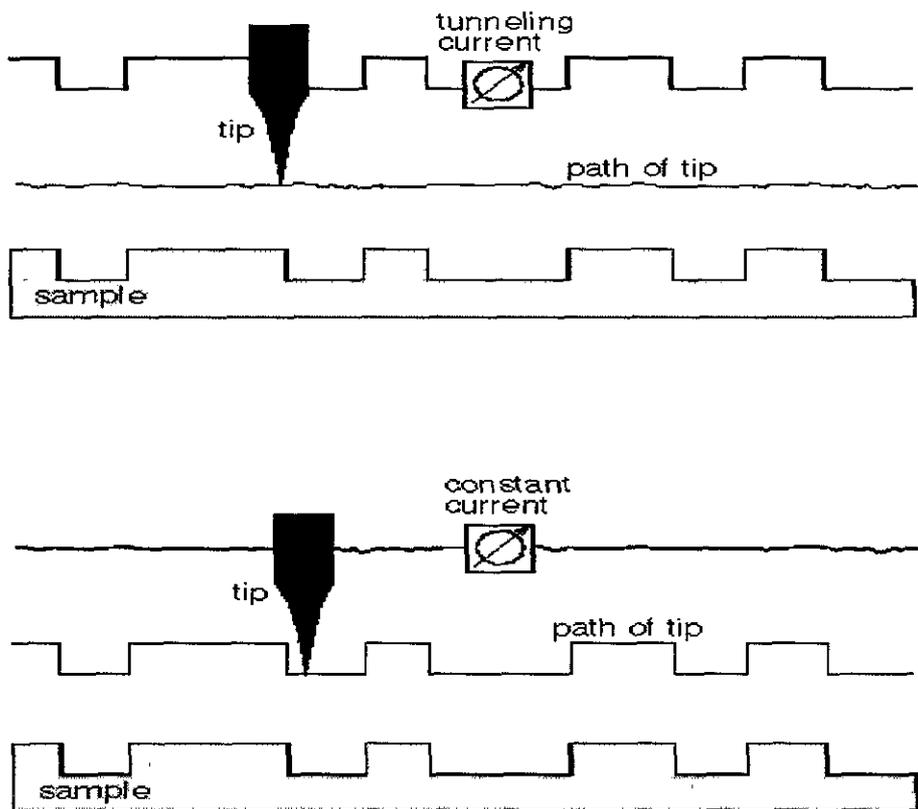


Fig.5 Comparación de modos de altura constante y corriente constante para STM.

Actualmente, los STMs sensan realmente el número de estados electrónicos ocupados o sin ocupar indicados cerca de la superficie de Fermi, dentro de un rango de la energía determinada por el voltaje de polarización (ThermoMicroscopes, 2000). Más que la topografía física, mide una superficie de la probabilidad de túneleo constante.

La sensibilidad de los STMs en la estructura electrónica local puede causar problemas si se está interesado en determinar la topografía. Por ejemplo, si una región de la muestra se ha oxidado, la corriente de tuneleo se reduce considerablemente cuando la punta pase sobre esa área. En modo de corriente constante, el actuador piezoeléctrico acercará la punta para mantener la corriente de tuneleo del conjunto. El resultado puede ser que la punta haga un agujero en la superficie. Con esta perspectiva, la interpretación de las imágenes no es real, desde el punto de vista del movimiento de la punta (una corriente de tuneleo más baja se detecta) y puede interpretarse como un agujero en la topografía de la superficie (aumentos de distancia de punta-superficie) o una conductividad local más baja (ThermoMicroscopes, 2000).

Sin embargo, la sensibilidad en la estructura electrónica de los STMs puede ser una enorme ventaja. En contraste con otros microscopios electrónicos y técnicas analíticas de superficies que usan electrones, el STM puede operarse en aire y en líquidos, así como en vacío porque no hay electrones libres involucrados. Por consiguiente, la aplicación de STM no se limita a la ciencia de superficies, sino que tiene un gran potencial para estudios electroquímicos *in situ* y en investigaciones de especímenes biológicos *in vivo* (Valenzuela-Benavides, 1998).

Este tipo de microscopios no usa lentes para formar imágenes. En su lugar utilizan una punta aguda que funciona como sensor para detectar inhomogeneidades de la superficie de la muestra. Por consiguiente, las distorsiones de la imagen debido a las aberraciones ópticas no ocurren. Los electrones involucrados en STM tienen una energía de unos cuantos electronvolts (eV), en contraste con los microscopios electrónicos de alta resolución, donde los electrones tienen energías de 10^4 a 10^6 eV, que inducen cambios y probables daños en la muestra. Puede argumentarse que energías electrónicas del orden de 1 eV, usadas en experimentos de STM, no podrían resolver átomos individuales, porque la longitud de onda del electrón correspondiente:

$$\lambda = \frac{12.25 \text{ \AA}}{\sqrt{E}} \approx 12 \text{ \AA}$$

es mayor que la distancia interatómica típica en sólidos (de aproximadamente 3 Å). Sin embargo, el STM se opera en el llamado "campo cercano", régimen donde la distancia d entre la punta y la superficie de la muestra es típicamente de unas cuantas unidades de Ångstrom, es comparable a la longitud de onda del electrón $\lambda \approx d$.

El rasgo más importante de STM, sin embargo, podría ser que este tipo de microscopía proporciona información local, finalmente con resolución atómica, directamente en espacio-real, en contraste con experimentos de difracción tradicionales, usados para determinar la estructura de la materia condensada. La información del espacio-real es particularmente importante para el estudio de detalles no-periódicos, como defectos (vacancias, átomos intersticiales, sitios de impureza, pasos, dislocaciones y límites de grano) y otras inhomogeneidades químicas. Por consiguiente, el STM tiene el más grande potencial para la investigación de sistemas complejos, como materiales multicomponentes, muestras policristalinas con granos y límites de grano, compuestos y materiales nanoestructurados (Valenzuela-Benavides, 1998).

La información obtenida por sondas locales, como STM, y los experimentos de difracción de rayos X pueden considerarse como complementarios. Los experimentos de difracción proporcionan datos promedio en áreas microscópicas y distancias interatómicas o repisas constantes para los materiales cristalinos con una exactitud que nunca puede ser alcanzada por sondas locales. Sin embargo, los experimentos de la difracción generalmente no proporcionan un cuadro exacto del grado de desorden y la naturaleza de los defectos de las estructuras. Por ejemplo, se ha confirmado que una superficie que muestra puntos de difracción claros con la técnica de difracción de electrones de baja-energía (LEED), puede parecer muy defectuosa cuando se compara con imágenes obtenidas por STM. Esto a veces podría ser peligroso cuando se deducen conclusiones para la superficie entera, por la información obtenida en pocas áreas de pequeñas dimensiones laterales (Valenzuela-Benavides, 1998).

Una herramienta que es capaz de "ver" los átomos ha tenido un gran impacto ciertamente, pero los nuevos microscopios también pueden manipular átomos. En 1990 investigadores de IBM manipularon los átomos de xenón en una superficie de níquel para escribir "IBM". Con letras de cinco átomos fueron capaces de constituir varias formas geométricas con átomos férricos. Este es un ejemplo de lo que está empezando a ser la llamada nano-ingeniería: el proceso de manipular

materiales a nivel atómico. Al centro de esta revolución está el microscopio de barrido por tunelamiento (Valenzuela-Benavides, 1998).

5.1.1. Efecto túnel

Un aislador puede ser distinguido de un conductor por su incapacidad para conducir electricidad, por ejemplo, si nosotros aplicamos una diferencia de potencial a dos alambres de cobre separados y los ponemos en vacío, no debe haber ninguna corriente a través del espacio, que es un aislador, hasta que los dos alambres se toquen. Sin embargo, cuando realizamos el experimento, una corriente pequeña se detecta cuando la separación es del orden de 50 \AA , y aumenta rápidamente cuando la separación disminuye. Este fenómeno es conocido, en el mundo de la física cuántica, como el efecto túnel de electrones. La Física Clásica no explica este fenómeno, ya que un electrón con energía total E no puede penetrar en una barrera de energía potencial U mayor que E , puesto que como $E = U + \frac{1}{2}mV^2$, significaría en este caso que la energía cinética es negativa, es decir, que la velocidad sería imaginaria, lo cual no es posible en mecánica clásica.

El efecto túnel entre dos metales (que en el caso de nuestro interés correspondería a la muestra y la aguja), el espacio entre ellos puede ser considerado como una barrera de potencial electrostático, ya que para sacar un electrón de cualquiera de los metales, es necesario dar energía suficiente (la llamada función de trabajo) al electrón. Por ejemplo, esto es posible iluminando el metal con luz ultravioleta (efecto fotoeléctrico). La Fig.6a muestra un diagrama de potencial electrostático, en función de la distancia de un sistema metal-espacio-metal. Cada metal está caracterizado por su energía de Fermi E_{F1} y E_{F2} (proporcional a la concentración de electrones) y su función de trabajo (ϕ_1 y ϕ_2) (energía mínima para colocar un electrón en el vacío, lejos de la influencia del sólido metálico). Para nuestros propósitos, es suficiente considerar este sistema en una dimensión, porque las distancias laterales son mucho mayores que la separación típica entre los metales.

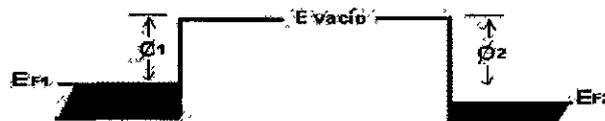


Fig. 6a

Cuando los metales se equilibran termodinámicamente por ejemplo colocando un conductor en los extremos, y se acercan suficientemente, tendremos que los niveles de Fermi se igualan, como se muestra en la Fig. 6b:

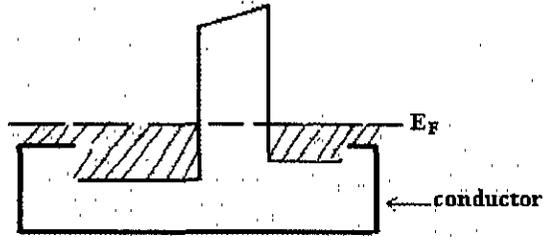


Fig.6b

En esta igualación de los niveles de Fermi, se ha involucrado una corriente electrónica transitoria a través del cable conductor. Si se aplica una diferencia de potencial, tendremos la situación de la Fig. 6c

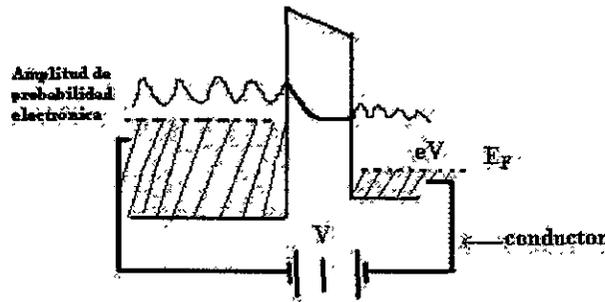


Fig 6c

Y en este caso, si la barrera es suficientemente delgada, muchos electrones del lado izquierdo tendrán lugares desocupados en el lado derecho: las colas de probabilidad de cada electrón se extenderán a través de la barrera, manifestándose experimentalmente como una corriente de tunelamiento, dada por: $I \propto e^{-2kd}$

Donde $K^2 = 2 \text{ MeV} / h^2$:

(ξ)

donde V es el voltaje aplicado, h es la constante de Planck, m es la masa del electrón y e la carga electrónica.

La expresión (ξ) se obtiene de los libros de texto elementales de la mecánica cuántica, al resolver la ecuación de Schrödinger en sistemas unidimensionales. Esta expresión es la clave de la sensibilidad de los microscopios de tunelamiento: si se reduce (aumenta) la separación entre la aguja y la superficie de la muestra por un ángstrom, la corriente aumenta (se reduce) un orden de magnitud.

5.2. Microscopía de Fuerza Atómica

Otro miembro de esta clase de instrumentos, el microscopio de fuerza atómica (AFM) se ha convertido en una herramienta muy usada en investigación biológica (Hansma *et al.*, 1997).

Este instrumento puede operar tanto en medio líquido como en aire, además de que es posible obtener imágenes de moléculas biológicas en amortiguadores acuosos, esto es, bajo condiciones estrictas de su ambiente natural. La resolución del AFM es determinada por el radio de curvatura de la punta y es típicamente entre 5 y 10 nm. El AFM es el único microscopio que puede llevar a cabo resolución a la escala nanométrica en muestras biológicas “*in situ*” (Bustamante y Keller, 1995).

Binnig tuvo la idea para el microscopio de fuerza atómica en 1985 mientras estaba en California, con una licencia del laboratorio de investigación de la IBM en Zurich Suiza, él había estado ocupado con su trabajo sobre el microscopio de exploración por tuneo y con la ayuda de otros empezó a pensar en nuevas ideas. Mientras en California, como visitante en la Universidad de Stanford, en el Centro de Investigación de la IBM Almaden, le vino la inspiración para construir el microscopio de fuerza atómica (Rugar y Hansma, 1990).

Él se preguntaba por qué la superficie debe ser siempre imaginada como una corriente; ¿Por qué no una fuerza? Entre otras cosas, usar una fuerza tendría la ventaja que las muestras no conductoras podían ser exploradas, a diferencia del microscopio de exploración por túnel. Binnig habló de sus ideas con Christopher Gerber de la IBM y con Calvin Quate de Stanford, y cuando calculaban las fuerzas entre los átomos, se sorprendieron cuando encontraron que era factible hacer fácilmente un cantilever con una elasticidad constante de resorte equivalente a la existente entre los átomos. Por ejemplo, las frecuencias vibratorias ω del límite de los átomos en una molécula o en un sólido

cristalino son típicamente 10^{13} " hertz o más arriba. Combinando esto con la masa de los átomos, del orden 10^{-25} kilogramo, da las constantes intraatómicas k del resorte, dadas por $\omega^2 m$, en el orden de 10 N/m. Por comparación, la constante de resorte de un pedazo del papel de aluminio de la casa que tiene 4 milímetros de largo y 1 milímetro de ancho es alrededor 1 N/m (Rugar y Hansma, 1990).

Ellos creyeron que si detectaban dislocaciones o desplazamientos a nivel de ángstrom con la elasticidad de un cantilever tan suave, podrían obtener imagen topográfica a escala atómica. Además, la fuerza aplicada no sería bastante grande para empujar los átomos fuera de sus sitios atómicos. Mientras que las ideas se consolidaban, Gerber fue capaz de construir el primer prototipo apenas en unos cuantos días (Rugar y Hansma, 1990).

Con los resultados que Binnig, Quate y Gerber obtuvieron con este prototipo se comenzó el campo de la microscopía de fuerza atómica.

5.2.1. Sistema de Control del AFM y Modo de Señal de Error.

En AFM, se usa un sistema de retroalimentación para controlar la fuerza de contacto entre la punta y la muestra. Para ello se mide la flexión del cantilever por medio de la reflexión del haz de un láser. El operador del equipo elige la fuerza de contacto y de esta manera la flexión de operación del cantilever. Al barrer la superficie las variaciones topográficas afectan la flexión del cantilever. El sistema de control debe reaccionar para restablecer la flexión inicial de operación, modificando la altura de la muestra, idealmente, el ajuste debe hacerse instantáneamente y en forma exacta. Sin embargo, tales demandas no son reales (Fig. 6 d) (Stroscio y Kaiser, 1993).

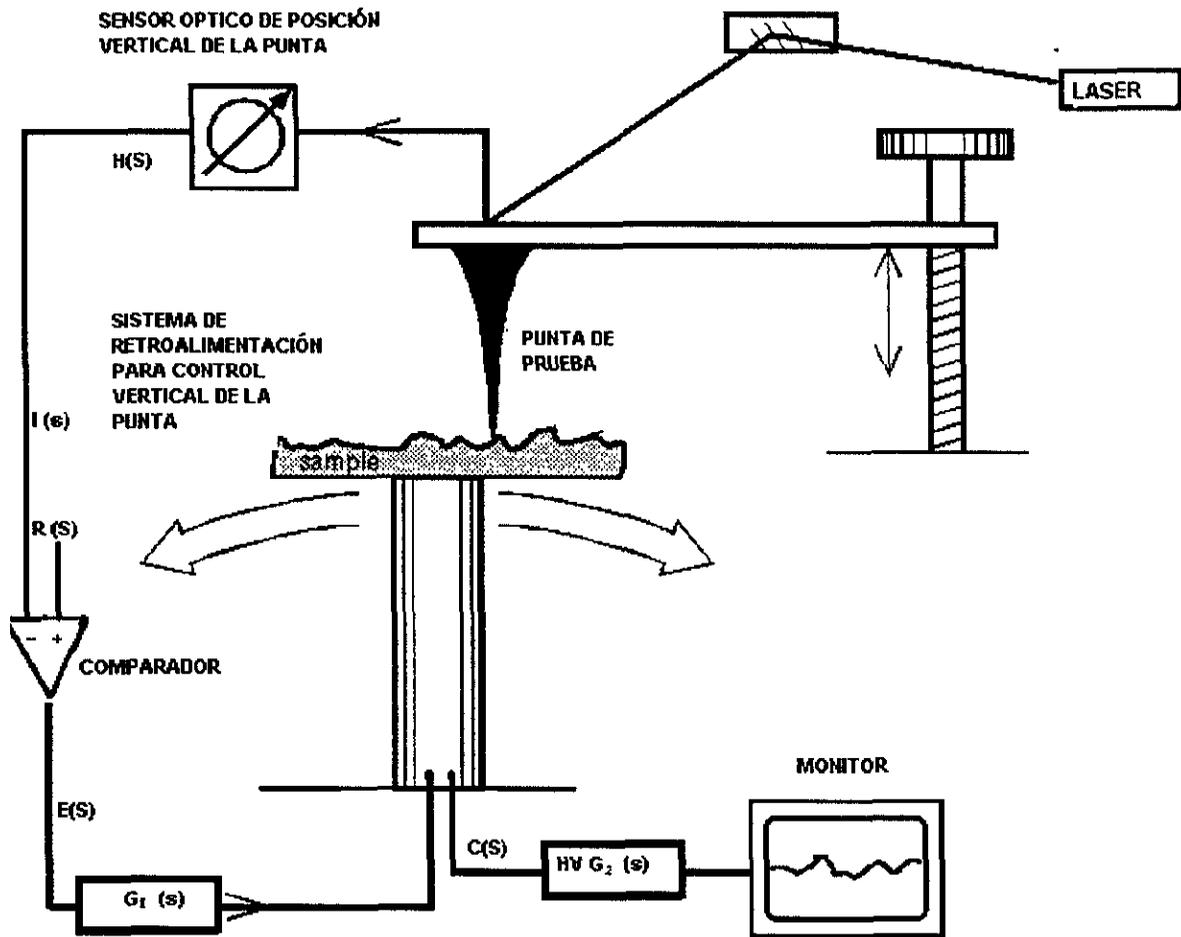


Fig. 6 d. Muestra un diagrama para el control del movimiento en Z del AFM.

El análisis es muy simple en las regiones lineales del funcionamiento del sistema. De hecho, los componentes tienen un comportamiento razonablemente lineal. Los sistemas lineales son muy bien analizados en el dominio de las transformadas de Laplace.

La transformada de Laplace, $F(s)$, de una función $f(t)$, se define así:

$$F(s) = \int_0^{\infty} f(t) e^{-st} dt \quad (1)$$

Obsérvese que del campo del tiempo real pasamos al campo de las frecuencias complejas $S = \sigma + i\omega$:

$$\{t\} \rightarrow \{S = \sigma + i\omega\} \quad (2)$$

$$\{f(t)\} \rightarrow \{F(s)\}$$

Las transformadas de Laplace son buenas para analizar sistemas lineales de control porque la respuesta de un sistema real se puede modelar con funciones sinusoidales de amplitud exponencialmente decrecientes. Para comenzar el análisis de un sistema de AFM cada bloque debe reemplazarse por su función de transferencia. La función de transferencia de un componente es la relación entre la transformada de Laplace de la variable de salida y la transformada de Laplace de la variable de entrada. Esta función describe la dinámica del sistema bajo consideración. Las funciones de transferencia de la Fig. 6 a son: a) $G_1(S)$, que es un amplificador de ganancia proporcional que incluye un amplificador de ganancia integral $G_1(S)$ tiene como entrada la función error $E(s)$, que es la diferencia del voltaje medido por el sensor de posición $H(s)$ y la referencia $R(s)$ (Stroschio y Kaiser, 1993).

El operador del equipo fija el parámetro de ganancia que especifica que tan rápido debe ajustarse la elongación del cilindro piezoeléctrico ante las variaciones topográficas. Obsérvese que hay un compromiso entre la ganancia y la minimización del error, ya que si se maximiza la ganancia, el sistema puede entrar en resonancia, lo que causa la inestabilidad sin control, y si la ganancia es poca, el error es grande, provocando imágenes topográficas distorsionadas. (monitor Z) (Stroschio y Kaiser, 1993).

La salida del amplificador de ganancia proporcional es monitoriada por el sistema de adquisición de datos, y al mismo tiempo es acondicionada por un amplificador de alto voltaje, que se conecta a los cuatro electrodos del actuador piezoeléctrico para elongarlo, si está en un valle de la muestra, o contraerlo si está en una montaña, lo que corresponde a un voltaje positivo o negativo. El sensor óptico $H(s)$ recibirá otra señal para retroalimentar el sistema, y de esta manera continuar los ciclos de retroalimentación al mismo tiempo que realiza el barrido (Stroschio y Kaiser, 1993).

¿ Qué relaciones existen entre las funciones de transferencias ?

La señal que actúa es el error:

$$E(S) = R(S) - I(S) \quad (3)$$

$$= R(S) - H(S) C(S) \quad (4)$$

Como la salida $C(S)$ esta relacionada con la señal que actúa por $G(S)$, tenemos:

$$C(S) = G(S) E(S), \quad (5)$$

$$\text{Donde } G(S) = G_1(S) G_2(S). \quad (6)$$

$$\text{Entonces } C(S) = G(S) [R(S) - H(S) C(S)] \quad (7)$$

$$\text{y entonces: } C(S) = R(S)G(S)/1 + G(S) H(S) \quad (8)$$

$$\text{y el error es } E(S) = R(S)/1+ G(S) H(S) \quad (9)$$

Podemos concluir, de las ecuaciones (8) y (9) que los datos $\{ C(S) \}$ nos proporciona la topografía de la muestra, ya que involucra un amplificador de ganancia de seguimiento de los cambios en Z del cantilever, mientras que el conjunto de errores $\{ E(S) \}$ carece del factor de ganancia de seguimiento en el numerador, aunque esté presente en el denominador. Estos datos de error básicamente nos aportan una medida del desplazamiento del cantilever, con poca influencia de la corrección por la retroalimentación. El monitoreo de esta función es valioso para resaltar características topográficas tenues de las muestras (Stroscio y Kaiser, 1993).

5.2.2. Estructura del AFM

Todos los microscopios de fuerza tienen esencialmente cinco componentes:

---Una punta afilada montada en un muelle suave y elástico

---Una manera de sensar la desviación del muelle

---Un sistema de retroalimentación para supervisar y controlar la desviación (y fuerza de la interacción)

---Un sistema de barrido mecánico (normalmente un piezoeléctrico) que mueve la muestra con respecto a la punta de una manera de rastreo.

---Un sistema de despliegue que convierte los datos medidos en una imagen (Rugar y Hansma, 1990).

El barrido, la retroalimentación y sistemas del despliegue son muy similares a aquellos usados por el microscopio de barrido por tuneleo. Aunque los elementos básicos de todos los microscopios de fuerza son similares, los detalles de la aplicación varían. El microscopio de fuerza atómica original,

por ejemplo, usó un cantilever hecho a mano formado de un pedazo de lamina de oro aproximadamente de 1 mm. Una aguja de diamante pequeña sirvió como punta. Hoy, los cantilevers de AFM más avanzados son micro fabricados de silicio, óxido de silicio o nitruro de silicio usando técnicas fotolitográficas. Las dimensiones laterales típicas están en el orden de 100 micrómetros, con un espesor del orden de 1 micrómetro. Esta geometría da constantes de resorte en el rango de 0.1-1 N/m y las frecuencias resonantes de 10-100 kHz. Los muelles pueden fabricarse con puntas integradas, o también con láminas en las que pueden empotrarse astillas pequeñas de diamante hechas a mano (Rugar y Hansma, 1990).

El otro componente crítico del AFM es el sensor que detecta la desviación del muelle. Idealmente, el sensor debe tener sensibilidad de décimas de angstrom y debe ejercer una fuerza despreciable en el muelle.

Los esquemas de observación óptica son divididos en dos tipos básicos: interferometría y desviación del haz. Los dos métodos son capaces de medir desviaciones del muelle en el orden de 0.1 Å con una detección de longitud de onda hasta de 10 kHz. En una desviación típica del haz en AFM, la luz del láser de un diodo es reflejada especularmente desde una ventana parecida a la superficie del cantilever. La dirección del haz de la luz reflejada es detectada por la incidencia relativa en un fotodetector doble (Rugar y Hansma, 1990).

Los sistemas de Interferometría usados para microscopía de fuerza atómica han tomado muchas formas diferentes, y algunos de los más recientes métodos son casi tan simples como la misma desviación del haz. Una de las ventajas principales de la interferometría es que puede usarse con cantilevers que no tienen superficie reflejante. Esto es especialmente importante para imágenes magnéticas y electrostáticas que a menudo usan cantilevers de alambre fino. Algunos de los primeros interferómetros de AFM tenían una función bastante pobre a frecuencias bajas debido a la diferencia del camino óptico grande entre el haz de referencia y la luz reflejada del cantilever (Rugar y Hansma, 1990).

La interpretación de resolución atómica de las imágenes de AFM depende críticamente de los detalles de la interacción de la punta-muestra. Idealmente la interacción entre la punta y la muestra se lleva a cabo vía un solo átomo al final de la punta. Sin embargo, según cálculos teóricos que asumen fuerzas de interacción común, este ideal no se aplica en la práctica. En cambio, la fuerza

probablemente se transmite a través de una irregularidad pequeña en la punta, del orden de unos cuantos átomos (Rugar y Hansma, 1990).

Además de observar atómicamente estructuras de superficies lisas, el AFM tiene éxito con el despliegue de moléculas orgánicas, como ácido sórbico, ADN y proteínas. Para evitar daño a las moléculas, la fuerza de interacción debe ser menor que 10^{-8} N. Esto es difícil de lograr en aire debido a los meniscos de fuerza que surgen de una condensación capilar, esto es al agua y películas delgadas de hidrocarburo que se forman en las superficies. Una manera de superar este problema es operar el AFM con la muestra, punta y cantilever sumergidos en un líquido como agua o etanol (Rugar y Hansma, 1990).

Además de permitir fuerzas de interacción más pequeñas, el funcionamiento bajo agua también abre la posibilidad de observar muestras biológicas en un ambiente fisiológicamente natural. Por ejemplo, mediante AFM se puede determinar en tiempo real, la polimerización de fibrina, una proteína importante en la coagulación de la sangre. Las imágenes revelan que en las fases iniciales, el crecimiento de la cadena del polímero no ocurre por la suma de monómeros a unas cuantas cadenas largas, sino por la fusión de muchas cadenas cortas para formar cadenas progresivamente más largas (Rugar y Hansma, 1990).

Quate en 1994 reportó que la microscopía de fuerza atómica emergió bajo el tutelaje de tres personajes principalmente: Gerd Binnig, Christoph Gerber y Tom Albrecht. Este último fabricó el primer microcantilever basándose en silicio. Cuando el grupo de Zurich obtuvo la primera imagen de un patrón 7×7 de Si (III) el mundo de la ciencia de superficies conoció una nueva herramienta para la exploración de superficies que se tenía al alcance de la mano. De ahí surgieron resultados interesantes en el laboratorio de Paul Hansma en Santa Barbara (Quate, 1994).

McClelland con el grupo de la IBM /Almaden estudió la fuerza sobre el cantilever cuando la punta se encontraba a una distancia cercana a la superficie de la muestra. Descubrió que la curva de fuerza contra distancia para el ciclo del retiro era distintamente diferente de la del ciclo del acercamiento. Ellos concluyeron que debe haber una finísima capa o película líquida que cubre la superficie y cuando la punta penetra esta película líquida, una capilaridad es formada alrededor de la punta. La fuerza de capilaridad en la punta es grande, originando otras fuerzas además de producir histéresis en la curva de fuerza contra distancia (McClelland *et al.*, 1987).

El grupo de Paul Hansma en Santa Barbara razonó que si el barrido era posible con la punta penetrando la película esto sería igualmente posible para el sistema operar con el cantilever entero inmerso en el fluido. Esto llevó la microscopia de fuerza atómica a las áreas de Electroquímica y Biología (Marti *et al.*, 1987).

Existen otras perspectivas para la biología molecular de DNA. El grupo de Bustamante, primero en Nuevo México y ahora en Oregón colabora con Helen Hansma en Santa Barbara y Keller en Nuevo México. Ellos han obtenido principalmente imágenes de biomoléculas (Ress *et al.*, 1993).

Eric Henderson en el estado de Iowa encontró que con el líquido en el instrumento se podrían tener imágenes de células enteras y delinear la estructura de las fibras internas de las células vivas (Henderson *et al.*, 1992).

Ohmi se interesó en la dureza de capas de Si y comprobó el crecimiento de óxidos en los substratos de Si. Este autor determinó que el valor RMS de rugosidad debe ser reducido de 1 a 2 Å para mantener la integridad de la entrada de óxidos (Ohmi *et al.*, 1992).

5.2.3. Modos de Operación del AFM

Varias fuerzas contribuyen típicamente a la desviación del muelle en AFM. La mayor fuerza normalmente asociada con microscopía de fuerza atómica es una fuerza interatómica llamada fuerza de Van der Waals. La dependencia de la fuerza de Van der Waals entre la distancia de la punta y la muestra se presenta en la Fig.7.

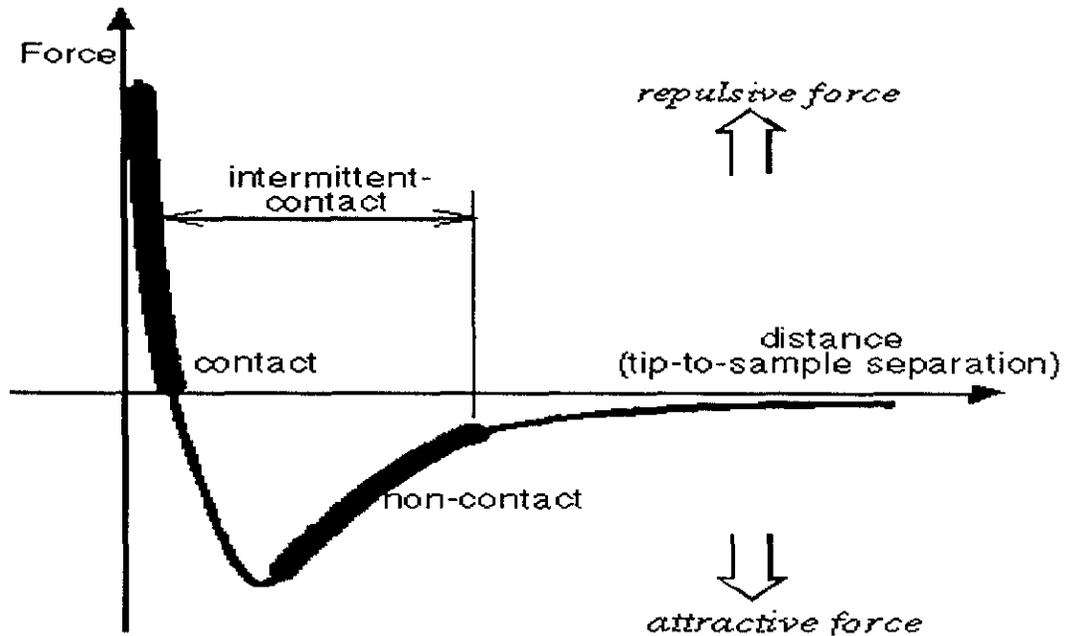


Fig.7 Curva de fuerzas interatómicas (Van der Waals) Fuerza Vs Distancia

Se muestran dos regímenes de distancia en la Fig.7 el de contacto; y 2) el de no-contacto. En el primero, el muelle se sostiene a menos de unos cuantos ángstrom de la superficie de la muestra, y las fuerzas interatómicas entre el cantilever y la muestra son repulsivas. En el régimen del no-contacto, el muelle se sostiene en el orden de diez a cientos de ángstrom de la superficie de la muestra, y las fuerzas interatómicas entre el cantilever y la muestra son atractivas (un resultado del largo alcance de las interacciones de Van der Waals) (ThermoMicroscopes, 2000).

5.2.3.1. Modo de Contacto

En el modo de contacto del AFM, también conocido como modo repulsivo, una punta de AFM hace suave "contacto físico" con la muestra. El cantilever tiene una constante de resorte menor que la constante de resorte eficaz que sostiene los átomos de la muestra juntos. Cuando la punta se encuentra por encima de la muestra, la fuerza de contacto del muelle se adapta de acuerdo a los cambios de la topografía. Para examinar este escenario más en detalle, refiérase a la curva de Van der Waals en la Fig.7.

Del lado derecho de la curva, los átomos están separados por una distancia grande. Cuando los átomos son gradualmente atraídos en forma débil, se va aumentando su atracción hasta que los átomos se acercan unos con otros, y en su nube electrónica empiezan a rechazarse electrostáticamente. Esta repulsión electrostática progresivamente debilita la fuerza atractiva, cuando

la separación interatómica disminuye. La fuerza llega a cero cuando la distancia entre los átomos alcanza un par de ángstroms, aproximadamente la longitud de una unión química (ThermoMicroscopes, 2000).

Cuando las fuerzas de Van der Waals son positivas (régimen repulsivo), las capas electrónicas externas de los átomos se traslapan. La pendiente de la curva de Van der Waals es muy grande en este modo de contacto. En AFM esto significa que cuando el muelle empuja la punta contra la muestra, el muelle se dobla en lugar de forzar los átomos de la punta más cerca a los átomos de la muestra. Aún cuando se diseña un mismo cantilever duro para ejercer fuerzas grandes en la muestra, la separación intraatómica entre la punta y los átomos de la muestra son improbables de disminuir. En cambio, la superficie de la muestra se deforma (ThermoMicroscopes, 2000).

Además de las fuerzas repulsivas de Van der Waals descritas arriba, otras dos están generalmente presentes durante la operación del AFM en modo de contacto: una fuerza capilar ejercida a menudo por una capa de agua delgada presente en condiciones ambientales, y la fuerza ejercida por el propio muelle o cantilever. La capilar ocurre cuando el agua se aglomera alrededor de la punta, aplicando una fuerza atractiva fuerte (aproximadamente 10^{-8} N) que retiene la punta en contacto con la superficie. La magnitud de la fuerza capilar depende de la separación de la punta y la muestra. La fuerza ejercida por el cantilever es parecida a la fuerza de resorte comprimida. La magnitud y señal (repulsiva o atractiva) de la fuerza del cantilever depende de la desviación del muelle y de su constante de resorte. Con tal de que la punta esté en contacto con la muestra, la fuerza capilar debe ser constante porque la distancia entre la punta y la muestra es virtualmente fija. También se acepta que la capa de agua es razonablemente homogénea. La fuerza inconstante en modo de contacto en AFM es la fuerza ejercida por el muelle. La fuerza total que la punta ejerce en la muestra es la suma de fuerzas tanto capilar como la del muelle, y debe estar equilibrando las fuerzas repulsivas de Van der Waals. La magnitud de la fuerza total ejercida sobre la muestra varía de 10^{-8} N a 10^{-10} N (con el cantilever separado de la muestra, el agua está separada de la punta, y el rango típico de operación es a de 10^{-6} a 10^{-7} N (ThermoMicroscopes, 2000).

La mayoría del AFMs actuales en el mercado detectan la posición del cantilever con técnicas ópticas. El esquema más común es el presentado en la Fig.8. Un rayo láser incide sobre la viga del cantilever en la parte de atrás de éste, y se refleja hacia el fotodetector (PSPD). El propio PSPD

puede medir desplazamientos de luz tan pequeños como 10\AA . Como resultado, el sistema puede detectar movimientos verticales a nivel subangstrom de la punta del cantilever (Fig 8).

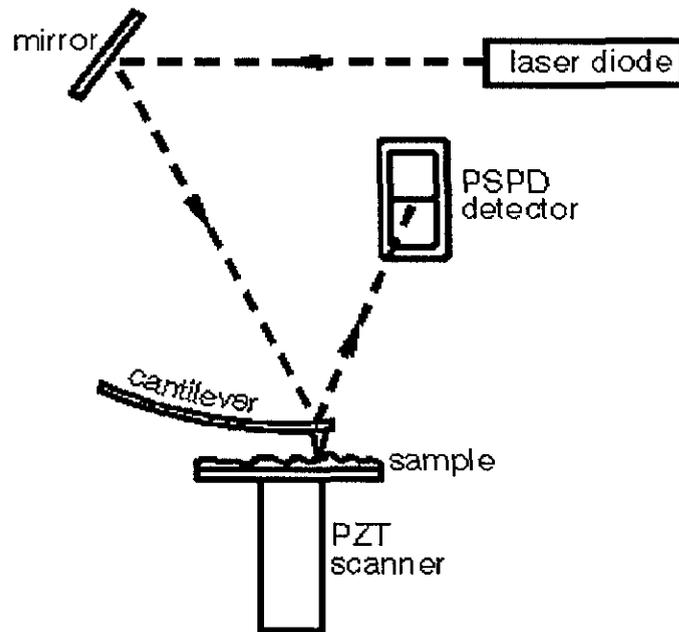


Fig.8 Esquema de detección de la incidencia del rayo láser.

Una vez que el AFM ha detectado la desviación del cantilever, puede generar los datos topográficos de operación en uno de los dos modos; altura constante o modo de fuerza constante.

En modo de altura constante, la variación espacial de la desviación del cantilever puede ser utilizada para generar los datos topográficos directamente porque la altura del escáner es fija cuando hace el barrido.

En modo de fuerza constante, la desviación del muelle puede ser utilizada como entrada a un circuito de retroalimentación que hace que se comprima o se elongue el escáner y responde a la topografía conservando constante la desviación del cantilever. En este caso, la imagen se genera por el movimiento del escáner. Con la flexión del cantilever en forma constante, la fuerza total aplicada a la muestra es constante, en principio.

En modo de fuerza constante, la velocidad de barrido está limitada por el tiempo de respuesta del circuito de retroalimentación, pero la fuerza total ejercida a la muestra por la punta es bien controlada. El modo de fuerza constante generalmente se prefiere para la mayoría de las aplicaciones.

El modo de altura constante se usa a menudo para tomar imágenes de superficies planas atómicamente, donde las desviaciones del muelle así como las variaciones en fuerza aplicada es pequeño. El modo de altura constante también es esencial para registrar las imágenes en tiempo real de las distintas superficies (ThermoMicroscopes, 2000).

5.2.3.2. Modo de No Contacto

El modo de No-contacto en AFM (NC-AFM) es una de las técnicas en que la punta se encuentra vibrando encima de la superficie de una muestra. La distancia entre la punta y la muestra para NC-AFM es del orden de decenas a centenas de ángstrom. Este espacio se indica en la curva de fuerzas de Van der Waals de la Fig.7 como el régimen de no-contacto (ThermoMicroscopes, 2000).

Esta microscopía puede ser utilizada para medir la topografía de aisladores y semiconductores así como los conductores eléctricos. La fuerza total entre la punta y la muestra en el régimen del no-contacto es muy baja, generalmente del orden de 10^{-12} N.

Esta fuerza baja es ventajosa para estudiar muestras suaves o elásticas. Una gran ventaja es que las muestras como las obleas de silicio no se contaminan a través del contacto con la punta (ThermoMicroscopes, 2000).

En modo de no-contacto, el sistema vibra con un cantilever duro cerca de su frecuencia resonante (típicamente de 100 a 400 kHz) con una amplitud de unas decenas a cientos de ángstrom. Entonces, se detectan cambios en la frecuencia resonante cuando la punta llega cerca de la superficie de la muestra. La sensibilidad de este esquema de detección proporciona la resolución vertical a nivel de subangstroms en la imagen, como con el modo de contacto de AFM (ThermoMicroscopes, 2000).

La relación entre la frecuencia resonante de la punta y las variaciones en la topografía de la muestra puede explicarse como sigue. La frecuencia resonante de un cantilever varía como la raíz cuadrada de su constante de resorte. Además, el resorteo constante del muelle se modifica con la

pendiente de fuerza experimentada por el cantilever. Finalmente, la pendiente de fuerza la cual es derivada de la curva fuerza contra distancia mostrada en figura anterior, señala los cambios en la separación de la punta la muestra.

Así, los cambios en la frecuencia resonante del muelle pueden usarse como una medida de modificaciones en la pendiente de fuerza que refleja variaciones en el espaciado punta-a-muestra, o topografía de la muestra.

En el modo NC-AFM, el sistema monitorea la frecuencia resonante o amplitud vibracional del cantilever y lo mantiene constante con la ayuda de un sistema de retroalimentación que mueve el piezoeléctrico hacia arriba o abajo. Conservando la frecuencia resonante, el sistema también mantiene el promedio de la distancia constante entre la punta y la muestra. Como en contacto AFM (en modo de fuerza constante), el movimiento del piezoeléctrico se usa para generar el conjunto de los datos (ThermoMicroscopes, 2000).

En NC-AFM la punta no sufre los efectos de degradación por las muestras, que son a veces observados después de tomar numerosos barridos con contacto AFM. Como se menciona arriba, NC-AFM también es preferible, al igual que en modo de contacto para medir muestras suaves. En el caso de muestras rígidas, el contacto e imágenes del no-contacto pueden parecer lo mismo. Sin embargo, si unas monocapas de agua condensada están quedando sobre la superficie de una muestra rígida, por ejemplo, las imágenes pueden parecer bastante diferentes. Un AFM que opera en modo del contacto penetrará la capa líquida para seguir el contorno topográfico de la superficie subyacente, considerando que en modo de no-contacto la imagen correspondería a la superficie de la capa líquida (ThermoMicroscopes, 2000).

5.2.3.3. Modo de Contacto Intermitente en AFM

El Contacto Intermitente en microscopía de fuerza atómica (IC-AFM) es similar a NC-AFM, sólo que para IC-AFM la punta del cantilever se encuentra vibrando más cerca en la muestra para que al fondo de su viaje sólo sean apenas unos golpes, o "palmaditas," a la muestra.

El IC-AFM que opera en la región indicada en la curva de fuerzas de van der Waals (Fig.7). En cuanto a NC-AFM, para IC-AFM los cambios de amplitud de oscilación del cantilever en respuesta

al espacio punta-muestra. Una imagen que representa la topografía de la superficie es obtenido por monitoreo de estos cambios (ThermoMicroscopes, 2000).

Algunas muestras se observan mejor con IC-AFM en lugar de contacto o no-contacto. IC-AFM tiene menos probabilidad de dañar la muestra que AFM de contacto porque elimina fuerzas laterales (fricción o rastreo) entre la punta y la muestra. En general, se ha encontrado que IC-AFM es más eficaz que NC-AFM para obtener imágenes con barridos mayores, que pueden incluir mayor rugosidad topográfica en la muestra. IC-AFM se ha convertido en una técnica de AFM importante, puesto que supera algunas de las limitaciones de los dos modos de contacto y no-contacto en AFM (ThermoMicroscopes, 2000).

A continuación en el siguiente esquema se representan las diferentes formas de SPM u otras técnicas de aplicación que tienen que ver con la familia de estos instrumentos (Fig. 9).

Scanning Probe Microscopy "Family Tree" (SPM)

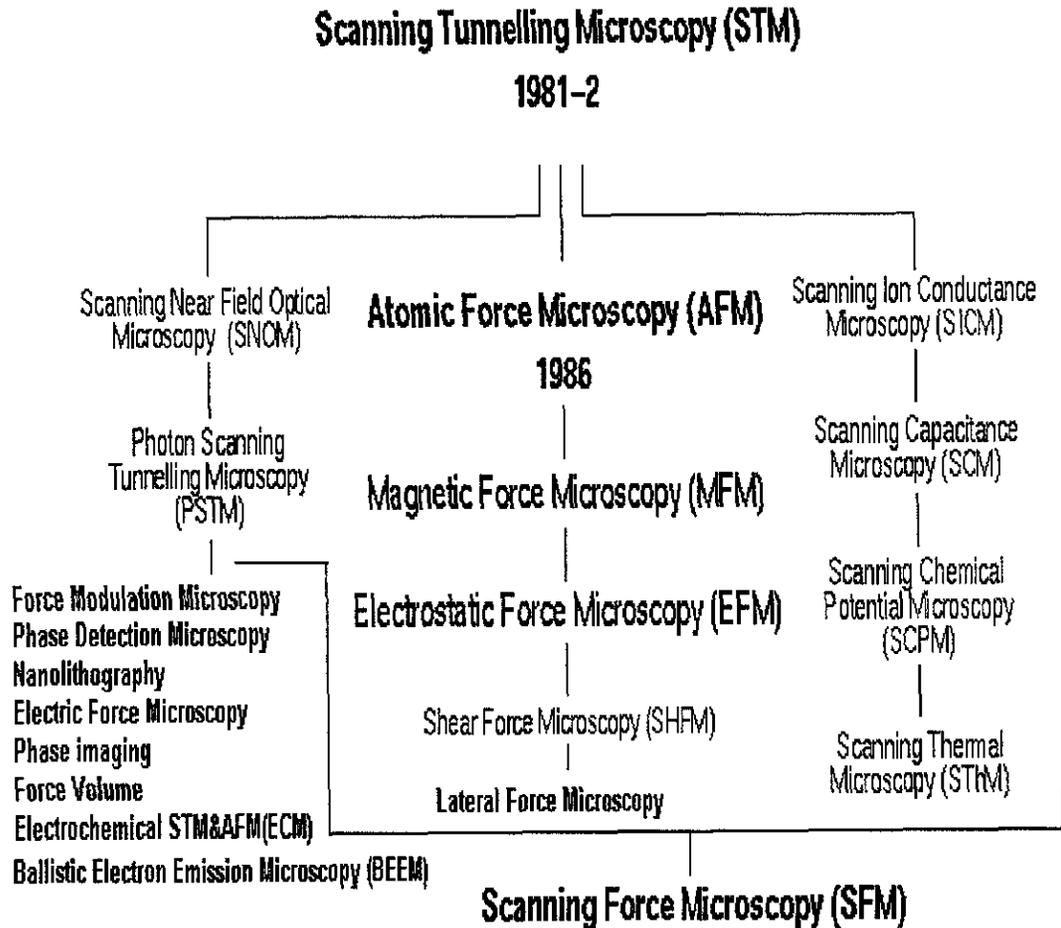


Fig.9 Representación esquemática de la familia de SPM Modificado de University of Bristol. Scanning Probe Microscopy. <http://teddy.phy.bris.ac.uk/spm/welcome.html>

IV. OBJETIVOS

General

Identificar diferentes estructuras celulares de *Lacandonia schismatica* por microscopía de fuerza atómica.

Específicos

- a) Analizar la posibilidad de observar estructuras celulares de *Lacandonia schismatica* en cortes semifinos de material procesado para microscopía electrónica de transmisión.
- b) Identificar la estructura de algunos componentes de la célula como las paredes celulares, el núcleo, el citoplasma, las vacuolas y los plástos.
- c) Identificar componentes nucleares como la cromatina, el nucléolo, los poros nucleares y elementos del nucleoplasma.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se obtuvieron plantas vivas de *Lacandonia schismatica* (E. Martínez y C. H. Ramos *Lacandonia schismatica*: Triuridales) colectadas de la selva Lacandona (Chiapas, México) y se procesaron muestras de ovarios. Muestras de estos órganos de aproximadamente 1 mm³ se fijaron con glutaraldehído al 2.5 y paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.16 M a pH 7.2 bajo condiciones de vacío por 15 min. Posteriormente durante 2 horas, a 4°C y una postfijación de tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4 °C. La deshidratación se llevó a cabo en series graduales de alcohol etílico, iniciando con el 30 % y terminando en el alcohol absoluto 100 %. La preinclusión se realizó con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica en proporción de 1:1, durante 16 horas a temperatura ambiente. La inclusión se realizó con resina epóxica que se polimerizó a 60 °C durante 16 horas. Se obtuvieron cortes de 60 a 90 nm. Posteriormente se utilizaron métodos de contraste convencional de acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo 0.3% y se observó al microscopio electrónico de transmisión. El mismo procedimiento se utilizó para preparar fragmentos de hoja de *Ginkgo biloba*.

b) Microscopía de Fuerza atómica

Para microscopía de fuerza atómica se obtuvieron cortes de 0.2 µm de espesor, a partir del material preparado para microscopía electrónica. Las muestras se colocaron sobre porta objetos de vidrio y se analizaron sin tinción en un Microscopio de Fuerza Atómica Autoprobe (Park Scientific Instruments) trabajando en modo de contacto. Las muestras fueron analizadas operando el microscopio a una frecuencia de barrido (scan rate) de 2-3 hertz, una fuerza de 10 nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias. Se utilizó una punta de nitruro de silicio de 100 Å de radio de curvatura, montada en un cantilever de 0.6 µm, el microscopio trabajó con un actuador piezoeléctrico de amplitud horizontal máxima de 100µm. Eventualmente se obtenían imágenes en modo de señal de error para su comparación con las imágenes tomadas en topografía. El análisis de las imágenes se realizó con el procesamiento de imágenes incluido en el software ProScan (tm) 1.51a.0001 (Park Scientific Instruments, 1993-1998). A continuación se presentan los diagramas de flujo para las dos metodologías aplicadas en este trabajo TEM Y AFM (ver diagramas 1 y 2).

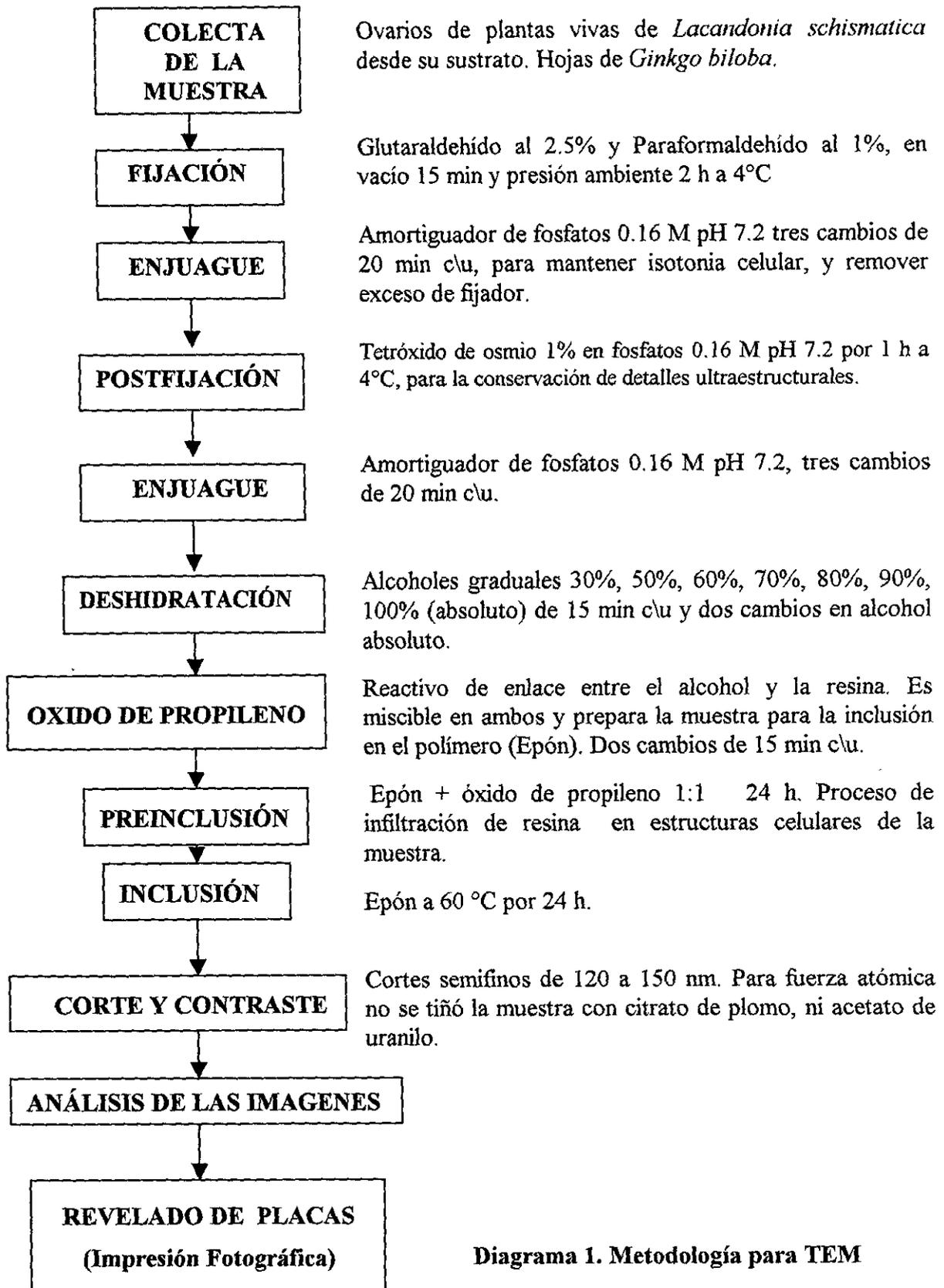


Diagrama 1. Metodología para TEM

**PREPARACIÓN
DE LA
MUESTRA**

(Encendido, carga del Software).

INICIO

Incidencia del haz al cantilever y
reflejo del haz, hacia el centro del fotodetector

**ALINEACIÓN DEL
HAZ DEL LÁSER**

Parámetros de calibración, tamaño de imagen,
ganancia de retroalimentación, fuerza (nN),
frecuencia de barrido, número de píxeles a
evaluar, (256 x 256) ó (512 x 512), calibración
scanmaster.

**PARÁMETROS
DE
BARRIDO**

**INSPECCIÓN
OCULAR DE
LA MUESTRA**

Selección de área en la muestra usando
Microscopio óptico con poder de 100x.

**POSICIONAMIENTO
DE LA
AGUJA**

La cabeza que contiene láser, sensores opto-
electrónicos de posición y cantilever es bajada
por tres motores de pasos, hasta que la aguja
queda en contacto con la muestra.

**CORRECCIÓN DE
PENDIENTE DE
LA TOPOGRAFÍA**

La aguja queda en un plano de la muestra para
efectuar el primer barrido

**IMAGEN
PRELIMINAR DE
MÁXIMO BARRIDO**

Observando las posibles fallas de barrido, así
como áreas no ideales de la muestra.

**SELECCIÓN
DE ÁREA
DE INTERÉS**

Optimizando todos los parámetros de barrido
para la obtención de una buena imagen.

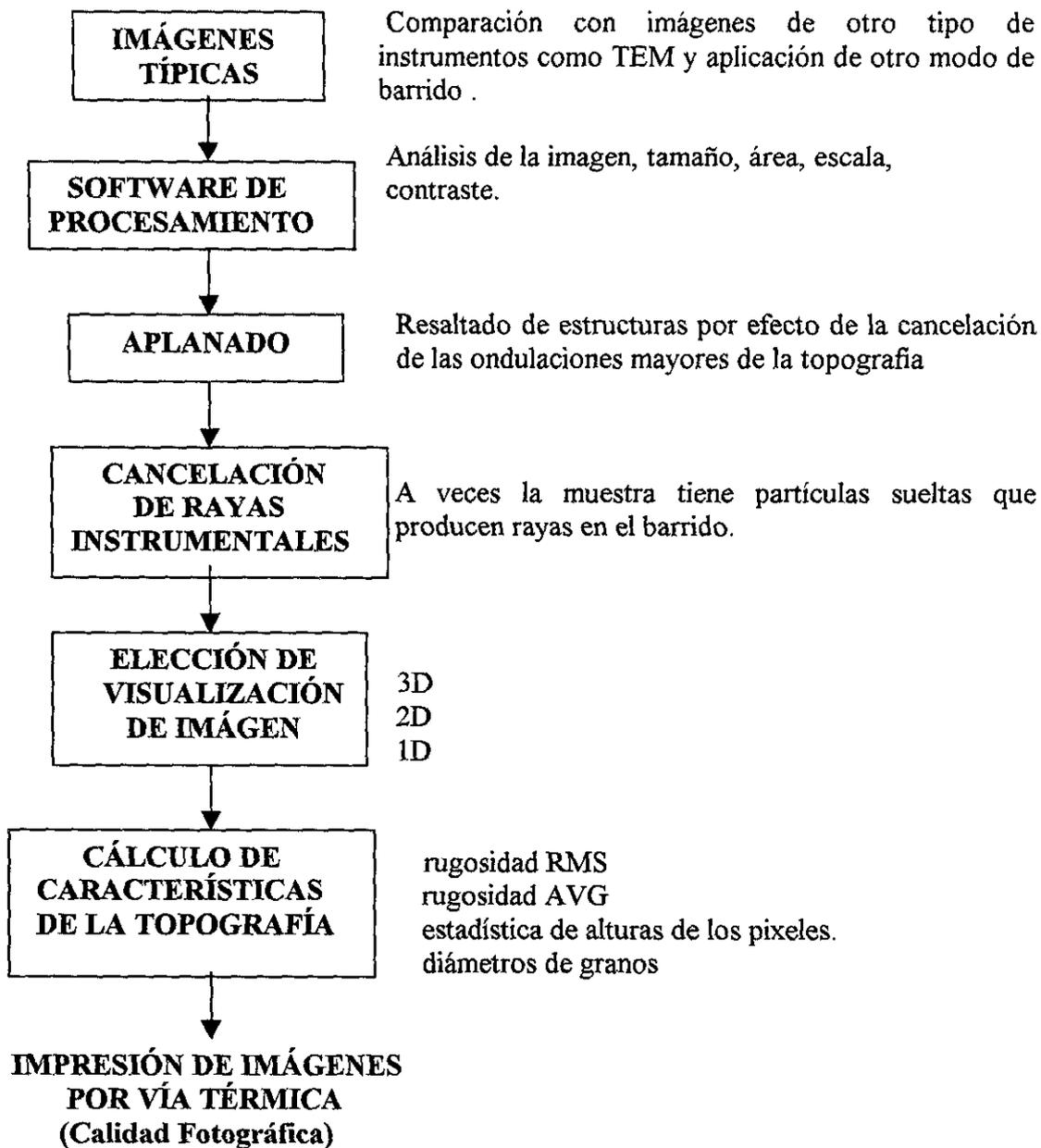


Diagrama 2. Metodología para AFM

VI. RESULTADOS

De los estudios de microscopía de fuerza atómica operando en modo de contacto sobre material procesado para microscopía electrónica de transmisión, se generaron diferentes imágenes. La figura 10 muestra la topografía de células de *Lacandonia schismatica*, en donde se observan algunos elementos tisulares y celulares bien definidos.

En la figura 11 se presenta un corte longitudinal de ovario en donde se detectan el saco embrionario y las células de los tegumentos. La célula marcada con flecha de cabeza grande señala una célula de tegumento en mitosis. La misma célula ha sido ampliada en la figura 12 y se puede apreciar un núcleo con su nucléolo, cromatina compacta, una vacuola y pared celular. En la figura 13 se puede observar cómo se nota esta misma imagen en forma tridimensional con la reconstrucción del programa de procesamiento de imágenes. Se aprecia la mayor resolución vertical que permite este instrumento y en el que nos da una idea panorámica de espacio de cómo podrían encontrarse los diferentes organelos en un espacio tan reducido dentro del citoplasma, puesto que esta planta tiene muy poco citoplasma y es difícil imaginar el acomodo de estos organelos en un espacio tan limitado. Además, en la misma imagen se aplicó un modo distinto de operación del microscopio llamado de señal de error, como se evidencia en la figura 14. Se pueden percibir nítidamente los contornos de las paredes celulares, y en el núcleo se observa una textura granular y características de bordes muy pronunciados. Además se nota el límite de los diferentes elementos membranosos con estructuras granulares que con una simple imagen topográfica no se alcanzan a distinguir. Este tipo de operación es aplicable cuando el sistema lo permite de acuerdo a las condiciones de altura vertical de la muestra, puesto que si la rugosidad de la muestra es mayor que $1.6 \mu\text{m}$ no es posible usar el equipo, además de que se dañaría la punta del cantilever. La superficie del corte tiene una textura que refleja la estructura celular presente sin necesidad de tinciones especiales para resaltar estructuras de mayor peso molecular como el que se realiza en TEM.

Fig.10 N:nucléo pc:pared celular

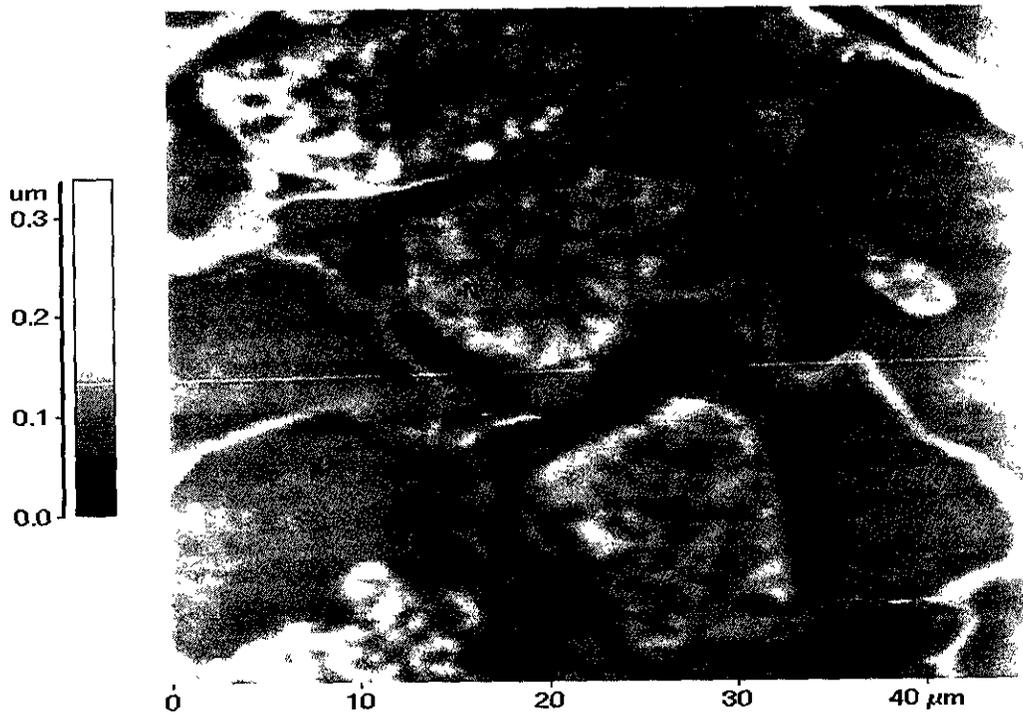


Fig.11 SE:saco embrionario T:células de los tegumentos

Flecha: célula en mitosis

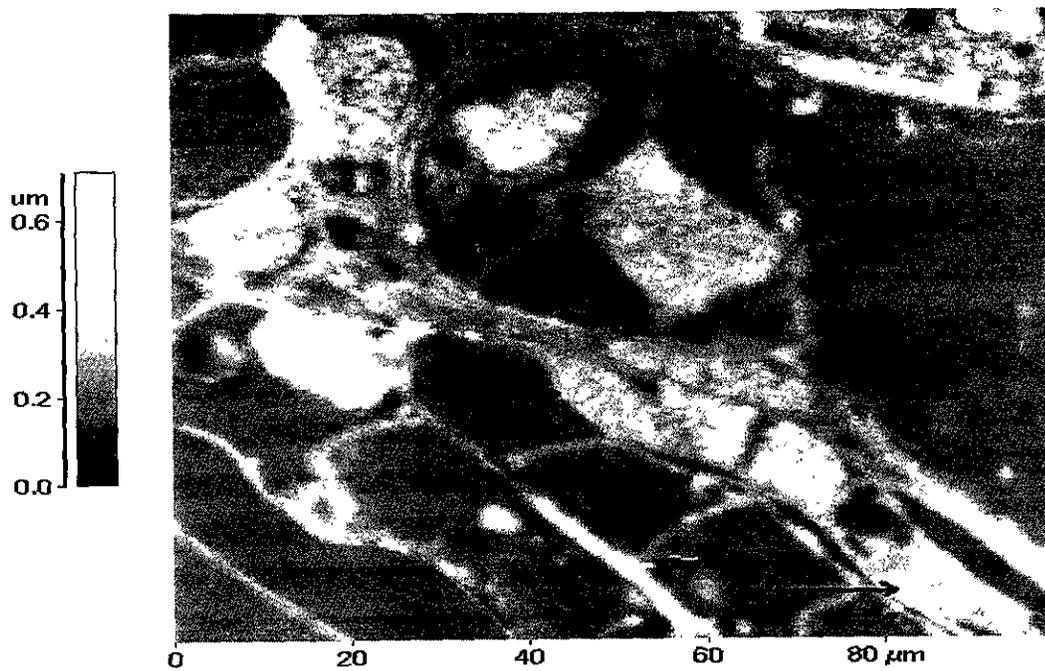


Fig.12 N:núcleo n:nucleolo c:cromatina V:vacuola

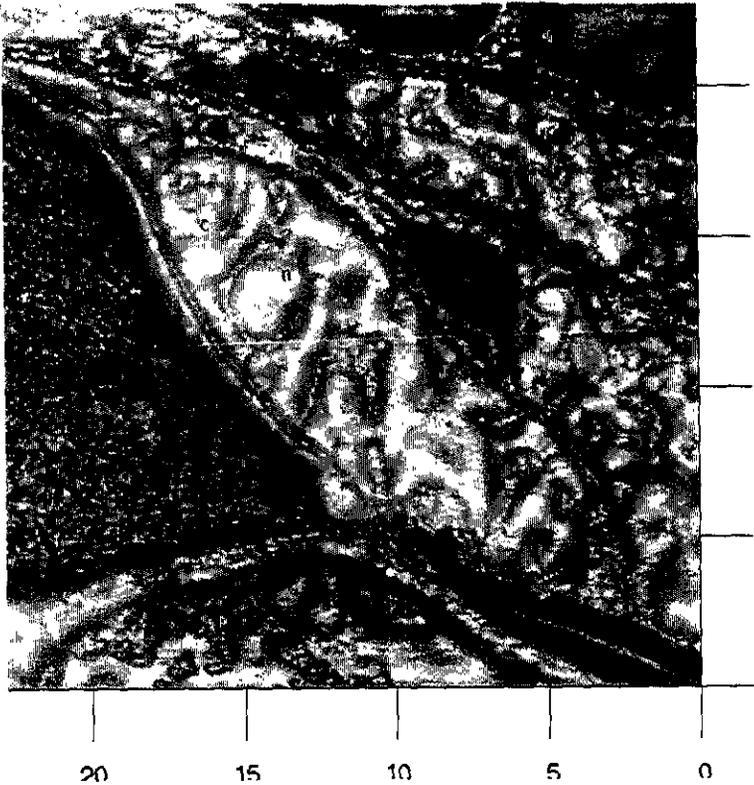


Fig.13

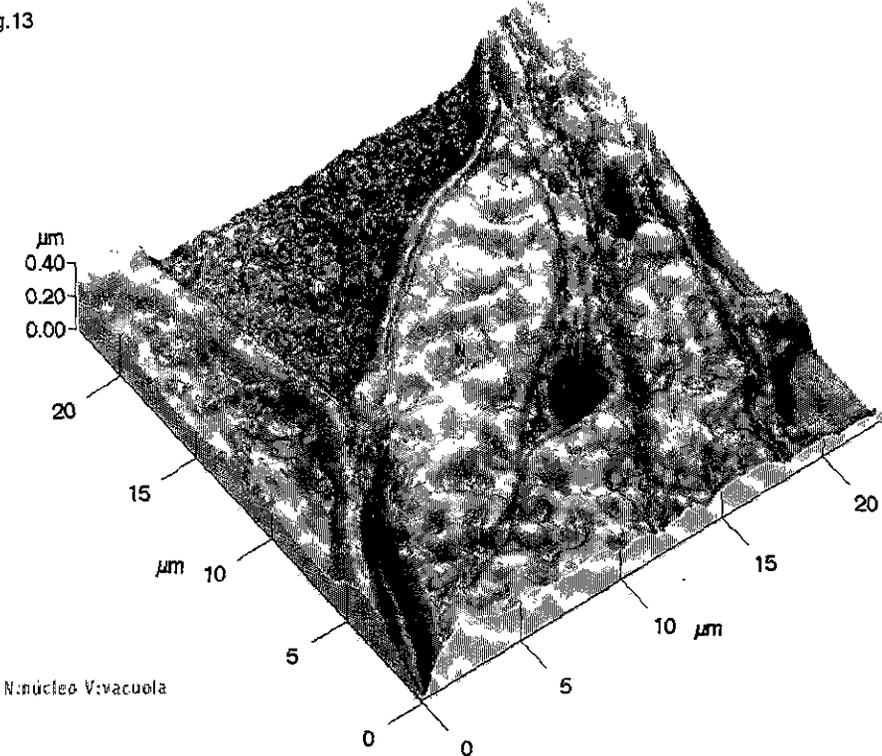
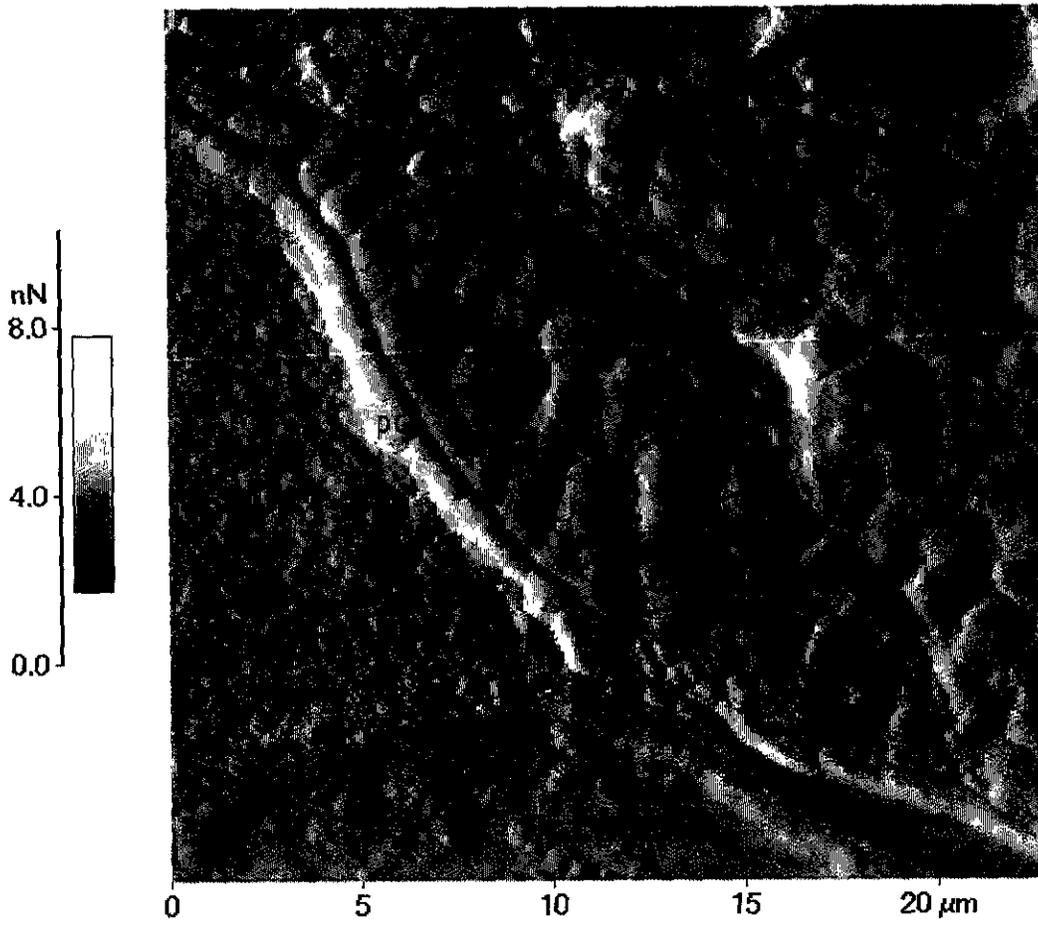


Fig.14 N:núcleo pc:pared celular V:vacuola



Se muestra que en el interior de la célula se destaca un núcleo voluminoso con un patrón de tipo reticulado para la cromatina, en general con dos nucléolos y una gran vacuola que abarca la mayor parte del volumen celular. Las vacuolas fueron vistas como espacios grandes en la célula. Los núcleos celulares fueron observados como estructuras grandes y redondeadas. En el citoplasma, representado por una capa delgada de material que corre muy cerca de la pared celular y rodea el núcleo, resaltan estructuras parecidas a mitocondrias o plastos (Fig. 15).

En la figura 16 se aprecian estructuras de botones florales de *Lacandonia schismatica* barridas a 100 μm , que se puede considerar a bajo aumento. Aquí se aprecian muchas células en los tegumentos, paredes celulares, núcleos con algunos nucléolos vistos como puntos muy brillantes y en la figura 17 a) se muestra otra imagen de barrido de 27 μm que se puede considerar a aumento medio. En estas imágenes se pueden apreciar rápidamente las paredes celulares en células de tegumentos. Además, el núcleo, el nucléolo, la cromatina y la vacuola son también reconocidos cuando son comparados con imágenes de microscopía óptica de luz y microscopía electrónica. Si vemos otra imagen en la que se aplicó el modo de señal de error también notamos características diferenciales en ambas imágenes: se aprecia el límite de la membrana nuclear con respecto al citoplasma, observándose, además, la textura granular del organelo o estructura más pequeña y conspicua que es el nucléolo (Fig. 17 b).

Se ha encontrado que en varias células, el núcleo es visto con una apariencia moteada bastante clara dentro de la célula. Las paredes celulares se observan como líneas muy brillantes, y en el núcleo se aprecia la cromatina formando una red, que es una de las características principales de esta planta. Si observamos estas imágenes a 10 μm (Fig. 18a) y 5 μm (Fig. 18b) se amplía la imagen y podemos identificar estructuras nucleares con más detalle. En estas imágenes se nota la cromatina reticulada, donde una red bastante clara ocupa el interior del núcleo celular, mientras que los espacios intercromatinianos se encuentran en las áreas oscuras en el nivel más bajo de acuerdo a la resolución vertical o dicho de otra manera en el nivel más bajo en el eje Z, sin embargo, la cromatina es una estructura abundante que tipifica la textura del corte. En grandes aumentos, entre la cromatina es posible identificar algunas otras estructuras que contribuyen a la topografía del corte. Muchas partículas fueron halladas en el nucleoplasma asociadas a la periferia de la cromatina compacta; estas partículas podrían ser componentes de cromatina o más probablemente partículas ribonucleoproteicas o RNPs.

Fig.15 N:núcleo pc:pared celular V:vacuola flechas:mitocondrios o plástidos

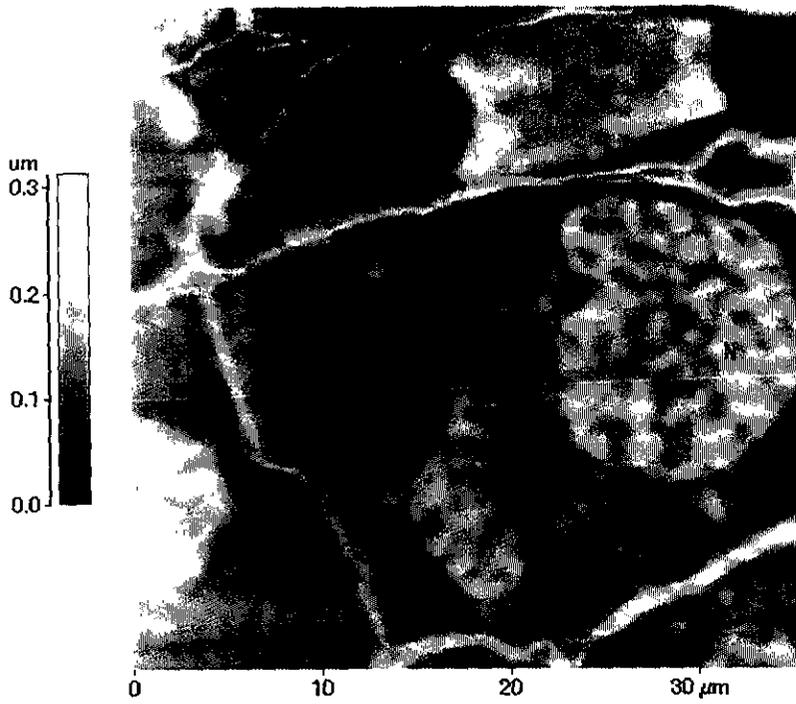


Fig.16 Tricélulas de los tegumentos pc:pared celular
flecha larga:núcleo flecha corta: nucléolo

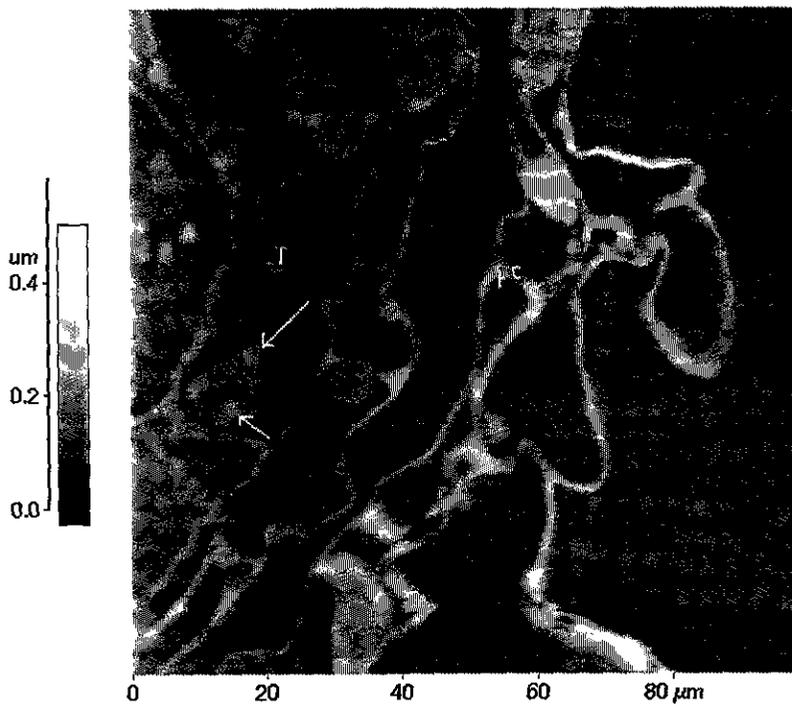


Fig.17a N:núcleo n:nucléolo pc:pared celular V:vacuola
c:cromatina

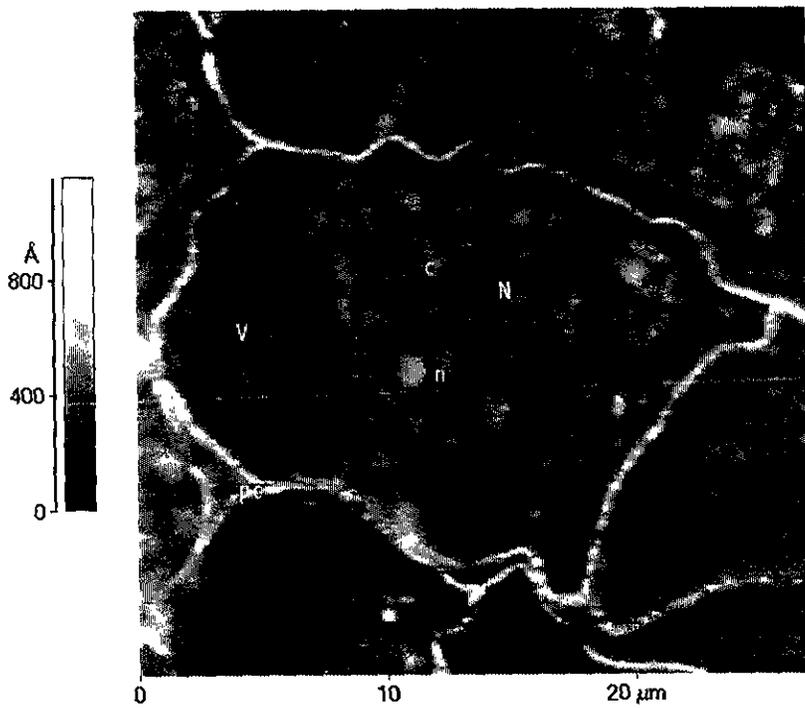


Fig.17b N:núcleo n:nucléolo

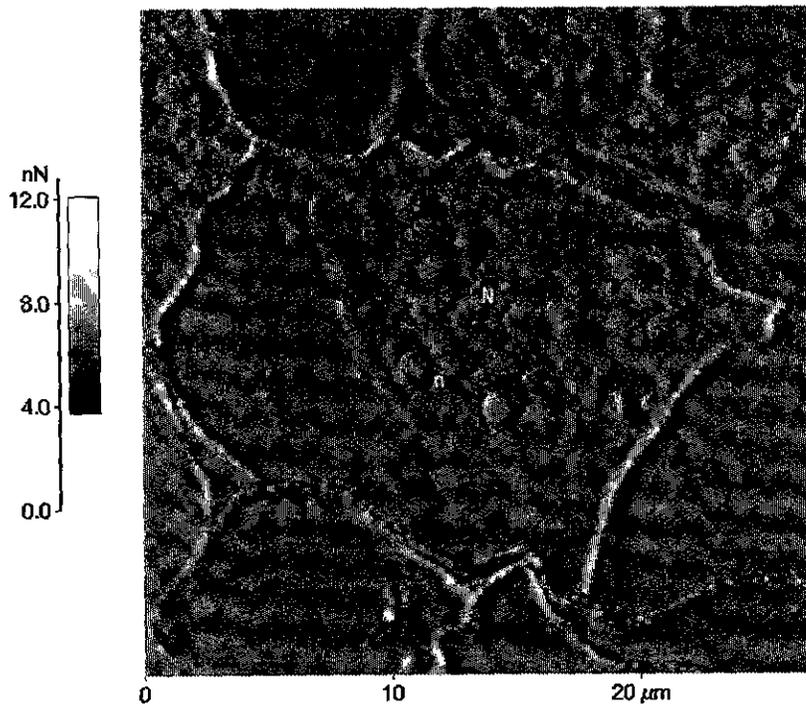


Fig.18a C:cromatina flechas: áreas cromatinarias

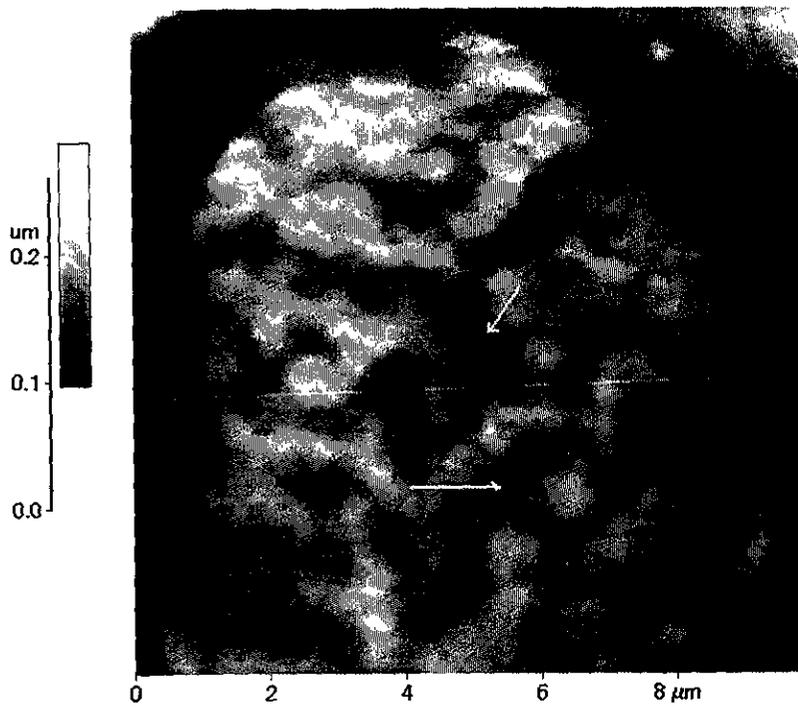
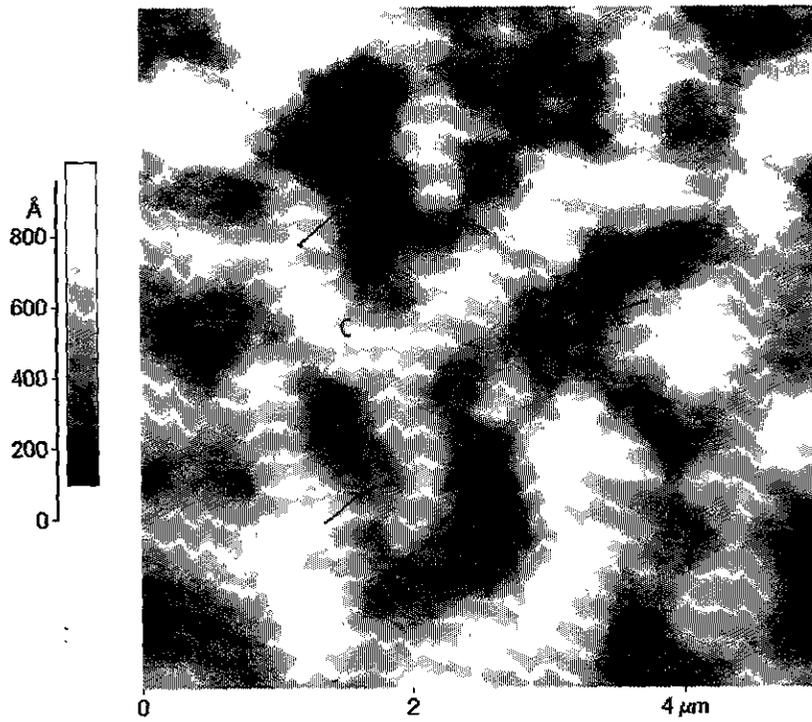


Fig.18b C:cromatina flechas:particulas en el nucleoplasma



Para comparar las estructuras citoplásmicas de *L. schismatica* con plantas que presentan verdaderos cloroplastos, se realizó también la observación de la estructura celular de *Ginkgo biloba*, donde los cloroplastos fueron abundantes, como se aprecia en la figura 19. *L. schismatica* no tiene cloroplastos debido a su naturaleza saprófita. Con el AFM se observó la topografía de los cloroplastos, incluyendo el almidón dentro. También se aplicó el modo de señal de error y se obtuvieron resultados de resalte de estructuras membranosas parecidas a las halladas con *L. schismatica* (Fig. 20). Además de estos resultados, se encontró que esta especie resulta ser un buen sistema para la observación de poros nucleares. Los poros nucleares en la figura 21 muestran las discontinuidades a lo largo de la periferia de la membrana nuclear, interrumpiendo la compactación de la cromatina y comunicando al nucleoplasma con el citoplasma, el cual se muestra como una capa muy fina rodeando al núcleo. El nucléolo en la figura 22 presente entre cúmulos de cromatina compacta muestra una textura que se correlaciona con estructuras en el nucléolo como componentes fibrilares y granulares, además de la región organizadora nucleolar (NOR) como se indica con flecha en la figura 22. Se observa cómo penetra la cromatina dentro del nucléolo en forma de grupos de cromatina compacta asociada con la envoltura nuclear.

Fig.19 Cl: Cloroplasto A Almidón

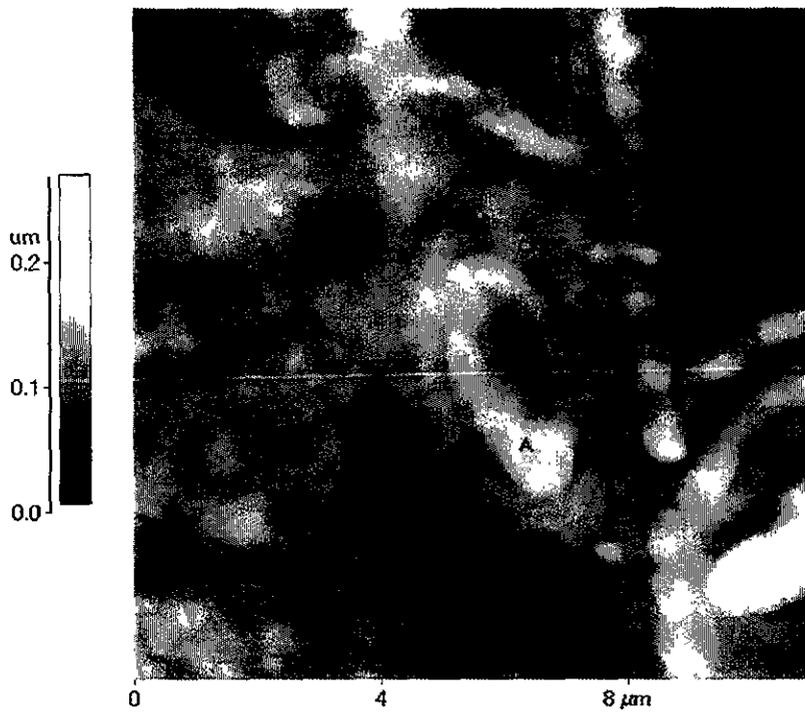


Fig.20 Cl Cloroplasto A: Almidón

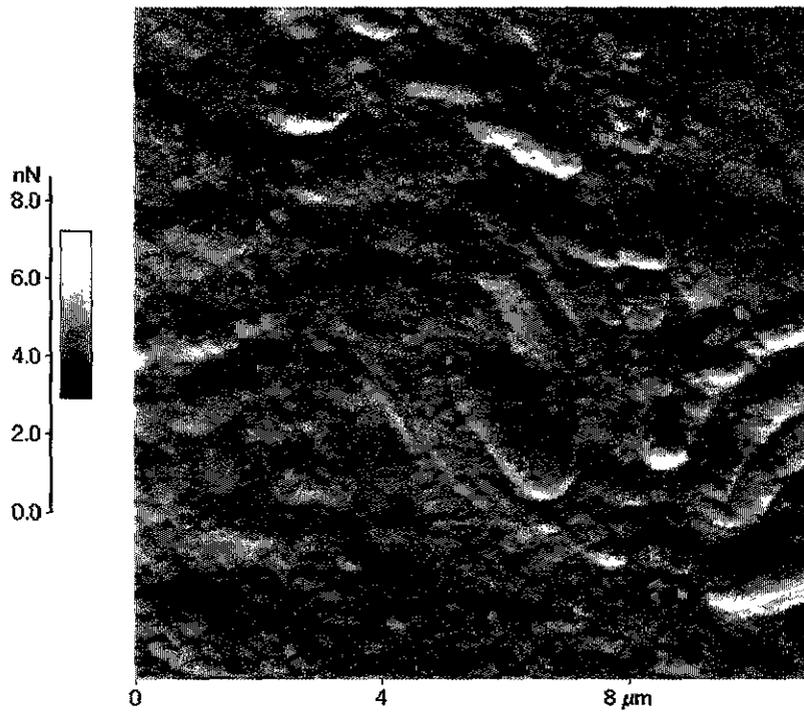


Fig.21 C: cromatina, flecha cabeza chica:poro nuclear
flecha cabeza grande:citoplasma

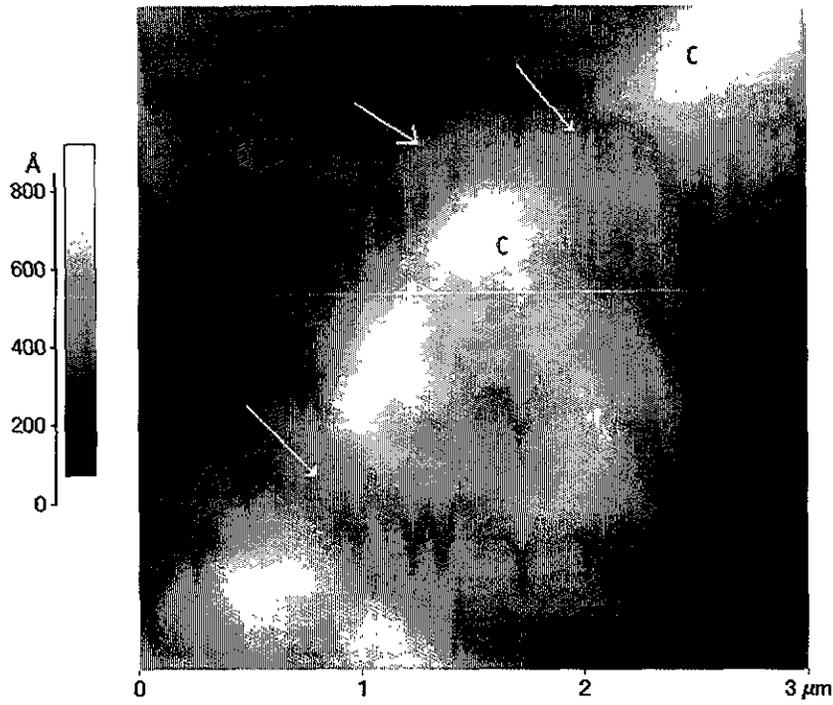
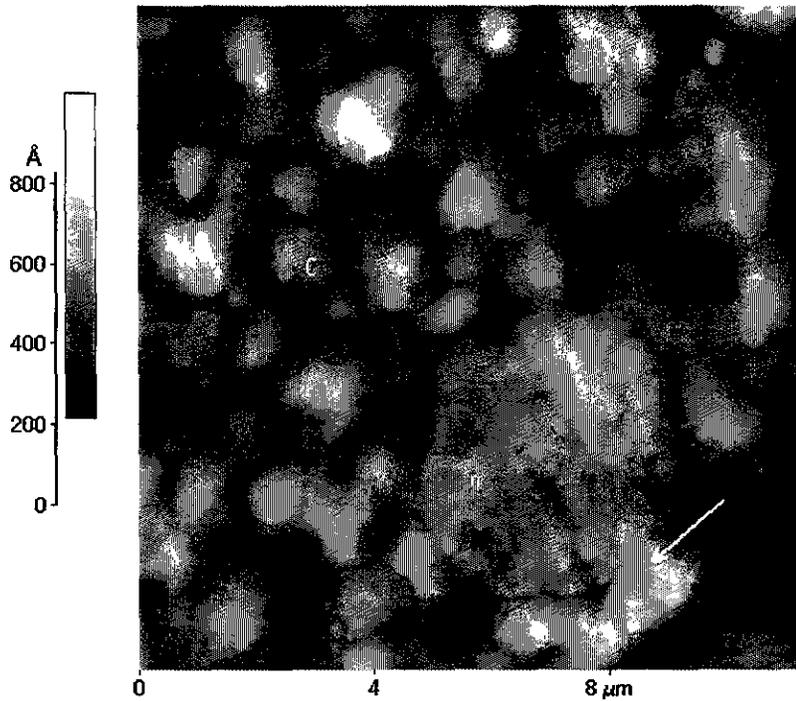


Fig.22 n:nucléolo c:cromatina flecha;región organizadora
nucleolar



VII. DISCUSIÓN

Con este trabajo se abre la posibilidad de observar estructuras celulares por medio de microscopía de fuerza atómica, aplicando esta técnica a material procesado para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes semifinos sin teñir de *Lacandonia schismatica* proporcionan de alguna manera la propiedad de que la muestra a observar para AFM debe ser lo bastante plana y con una rugosidad que permita el movimiento en las tres direcciones X, Y, Z del actuador piezoeléctrico según lo reportado por varios autores (Binnig *et al.*, 1986; Hansma *et al.*, 1997; Bustamante y Keller, 1995)

Este tipo de microscopio ofrece la ventaja de obtener resolución molecular o atómica de la materia de acuerdo a lo reportado (Binnig *et al.*, 1986). Este instrumento había sido aplicado solamente al estudio de materiales no orgánicos, y sólo recientemente se ha utilizado para el estudio de moléculas orgánicas aisladas o al análisis de células enteras (en Hansma *et al.*, 1997).

En este estudio se ha logrado obtener imágenes en tejido de la estructura del núcleo celular de plantas por microscopía de fuerza atómica. En las imágenes se pudieron reconocer poros nucleares, cromatina compacta, nucléolo y nucleoplasma, e inclusive fue posible detectar células en división mitótica. La mayoría de los trabajos de la literatura consultada han sido realizados sobre estructuras de núcleos aislados usando AFM (ver Hansma *et al.*, 1997; Stoffler *et al.*, 1999). Ningún esfuerzo se hizo previamente para analizar la estructura nuclear “*in situ*”. En este trabajo se han realizado cortes de células o tejidos para analizar su superficie con el objeto de obtener imágenes del interior de la célula, como es el núcleo celular. De hecho, además de tener una superficie muy plana lograda por el procesamiento del corte en el que se utilizó cuchillas de vidrio y de diamante, se obtuvo una textura que puede ser detectada sin ningún problema por el AFM y que además se relaciona con estructuras bien conocidas obtenidas por TEM.

En los resultados descritos anteriormente se mostraron imágenes en espacio tridimensional. Si consideramos la observación de series de imágenes a distintos niveles de cortes adyacentes y vaciando estos datos en un modelo, tendremos la capacidad de reproducir la estructura celular completa, e incluso de un núcleo. Con estos datos también es posible desarrollar reconstrucciones tridimensionales para obtener imágenes de resolución nanométrica, como la reportada para las

fibras nativas de cromatina, en donde muestran un modelo de fibras de cromatina en espacio tridimensional (Bustamante y Keller, 1995) Así podríamos comparar las imágenes del modelo con las imágenes reales, lo que sería de gran ayuda para interpretar imágenes de fuerza atómica en términos de entender la estructura molecular de la célula viva.

Además, la posibilidad de realizar experimentos sobre la superficie de cortes abre una nueva forma de aproximación a la estructura nuclear con resolución nanométrica. Los análisis de crio cortes deshelados en solución pueden también ser importantes para futuros estudios de AFM sobre núcleo celular.

El objetivo de la aplicación del modo de señal de error fue el de resolver la textura o tamaño de partícula más superficial del corte, en que la topografía convencional con retroalimentación no alcanzaba a resolver. Es así que aplicando este tipo de operación, se mide la flexión del cantilever dando como resultado imágenes muy nítidas y con una resolución aceptable de la textura granular de *L. schismatica*, misma que se correlaciona con lo observado por TEM (Agredano-Moreno *et al.*, 1994)

En AFM, al barrer la superficie, las variaciones topográficas afectan el cantilever, haciendo funcionar el sistema de control del microscopio para restablecer la flexión inicial de operación. El operador mantiene fijo el parámetro de la ganancia, que es el que especifica que tan rápido debe ajustarse la elongación del piezoeléctrico, ante las variaciones topográficas de la muestra (ver Strosio *et al.*, 1993).

Existe un compromiso entre la ganancia y la minimización del error; puesto que si aumentamos el valor del parámetro de la ganancia, el sistema puede entrar en un estado de resonancia provocando inestabilidad sin control. Por otro lado, si el parámetro de ganancia se aplica con un valor relativamente bajo, la señal de error es grande provocando imágenes topográficas distorsionadas visualizadas en el monitor.

En observaciones reportadas por Jiménez-García y Fragoso-Soriano (2000) se menciona que, utilizando células enteras de la línea NRK (riñón de rata normal) en cultivo, no se distinguieron estructuras nucleares, puesto que la membrana plasmática cubría la célula. Sin embargo, diferentes texturas fueron visualizadas en el núcleo, así como en el nucléolo y en el nucleoplasma. En la región nucleoplásmica, la textura observada puede relacionarse con las estructuras

subyacentes que son cubiertas por la membrana celular, y por consiguiente, puede también ofrecer información adicional. Por otro lado, nuestro enfoque permite la visualización del interior nuclear. Las estructuras reconocibles son aquellas que son bien conocidas para las especies utilizadas en este trabajo. La cromatina de *L. schismatica* ha sido bien estudiada usando microscopía de luz y microscopía electrónica (Jiménez-García *et al.*, 1992). De hecho, en ese trabajo se usó la reacción de Feulgen y ácido fosfotúngstico (PTA) para contrastar la cromatina, y aquellos métodos producidos para conocer el patrón reticulado para el DNA utilizadas para otras especies como cebolla y maíz (Lafontaine, 1974; Jordan *et al.*, 1980; Nagl, 1985).

Las ribonucleoproteínas asociadas con la periferia de esta red de cromatina han sido descritas a nivel de microscopía electrónica (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994; Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000). Estas partículas miden 32 nm de diámetro, son muy abundantes y pueden estar relacionadas con el metabolismo del ARN intranuclear (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994; Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000). Parte de este trabajo se enfoca a la visualización de la estructura de estas partículas con el uso del AFM.

Los poros nucleares son estructuras que han sido muy bien estudiados por AFM (ver Stoffler *et al.*, 1999). Aquí se ha observado su presencia como discontinuidades a lo largo de la periferia nuclear en grupos interrumpidos de cromatina compacta. El nucléolo fue también observable por AFM. El nucléolo de *Ginkgo biloba* ofrece un buen sistema para distinguir componentes granulares y fibrilares.

En estas especies ambos componentes son bien definidos y el componente fibrilar denso es abundante, tal como es revelado por microscopía electrónica (Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000). El componente fibrilar denso es el lugar donde se lleva a cabo la síntesis y pasos iniciales del procesamiento de pre-r-RNA (ver Wachtler y Stahl, 1993).

Además, la región organizadora nuclear (NOR) fue identificada como una región de cromatina penetrando al nucléolo como un paquete de cromatina presente en la periferia del núcleo celular en estas especies. Nuevos estudios están en proceso usando AFM para mejor entendimiento de la compartimentalización nucleolar y su papel en la biogénesis de los ribosomas.

VIII. CONCLUSIONES

1. La aplicación de la microscopía de fuerza atómica trabajando en modo de contacto, sobre cortes semifinos no teñidos de muestras de *L. schismatica* preparados para microscopía electrónica de transmisión, permitió distinguir diferentes estructuras de células del receptáculo de los ovarios.
2. La textura de los cortes de *L. schismática* se correlaciona con la presencia de estructuras celulares reconocibles como pared celular, citoplasma, vacuolas, plastos y núcleo.
3. En el núcleo celular, se reconocieron estructuras como la envoltura nuclear, la heterocromatina, el nucléolo, poros nucleares y partículas en los alrededores de la cromatina.
4. Con el modo de señal de error, se producen imágenes que nos ofrecen una panorámica de estructuras que por otras técnicas como TEM, no es posible observar. Además, la imagen de la superficie de los cortes, lograda por AFM en comparación con microscopía electrónica, ha revelado una estructura muy rugosa de la resina epóxica en cortes que fueron producidos con cuchillas de vidrio y de diamante.
5. Mientras que en microscopía electrónica convencional la resolución horizontal ha permitido observar detalles de dimensiones nanométricas, con el AFM se abre una posibilidad de obtener resoluciones similares o incluso mayores, pero de muestras que se encuentran en condiciones de presión ambiental y potencialmente en solución fisiológica. Futuras investigaciones se tendrán que realizar para estudiar más sobre los procesos dinámicos dentro del núcleo celular.

IX. REFERENCIAS

- Agredano–Moreno, L.T. 1991. Estudio ultraestructural comparativo del núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* E. Martínez y C.H. Ramos (Triuridales: Lacandoniaceae) y *Triuris alata* Brade (Triuridales: Triuridaceae). Tesis, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM; México.
- Agredano–Moreno, L.T. 1993. Estudio citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia*, partículas presentes en los núcleos de *Lacandonia schismatica* Martínez y C.H Ramos (Lacandoniaceae: Triuridales). Tesis, Especialidad en Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM; México.
- Agredano–Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H, Vázquez-Nin, G.H. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. Biol. Cell 82: 177-184
- Agredano-Moreno, L.T. y Jiménez-García, L.F. 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. Biol. Cell.92: 71-78.
- Baldeschwieler, J.D., Gill, J.M y West, P.E.1991. The scanning probe Microscope: A powerful tool for visualizing. The Micro World American Laboratory Feb.
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C, 1986. Atomic force microscope. Phys. Rev.Lett.56: 930-33 Oct.
- Bustamante C. y Keller R., 1995. Scanning Force Microscopy in Biology. Physisc Today 32-38 Dec.
- Coello, G., Escalante, A. y Soberón, J. 1993. Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) in its only known locality. Ann. Miss. Bot. Gard. 80: 898-901.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press.
- Davidse, G. y Martínez S., E. 1990. The Chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Syst. Bot. 15: 635-637.
- Diario Oficial de la Federación (Organo Informativo del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo Cd LXXXVIII No.10.1994

- Ezcurra, E., Felger, R.S., Russell, A.D. y Equihua, M. 1988. Freshwater islands in a desert sand sea: the hydrology, flora, and phytogeography of the Gran Desierto oasis of Northwestern México. *Desert Plants* 9:35-63.
- Fisher, R.A., Corbet, A.S. y Williams, C.B. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.* 12:42-58.
- Flora Mesoamericana-16 Mar 1999 Ejemplar(es) Representativo(s): México - Chiapas: , 30 Jan 1987, Martínez S., E. 19310 (MO).
- Gómez, P., y Martínez E, 1992. *Triuris* Miers. En: Flora Mesoamericana Vol. 6 Davidse, M.; Sousa S.; Chatters A. D Eds.
- Hansma, H. G., Kim. K. J., Laney, D. E., García, R.A., Argaman, M., Allen, M. J. y Parsons, S. M. 1997. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review, *J. Struct. Biol.* 119: 99-108.
- Halffter, G. 1991. Historical and ecological factors determining the geographical distribution of beetles (Coleoptera: Scarabaeidae Scarabeinae) *Folia Entomológica Mexicana* 82: 195-238
- Henderson, E., Haydon, P. G., y Sakaguchi, D. S., 1992. Actin filament dynamics in live glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 257: 1944-46.
- Jiménez-García, L.F., Agredano-Moreno. L.T., Segura-Valdez M. de L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H., Vazquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* 75: 101-110.
- Jiménez-García, L.F., Reynoso-Robles, R., Fragoso-Soriano, R.J., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L., González-Moreno, S., Ramos, C.H., y Martínez, E. 1998. Biología celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol.Soc.Bot. Méx.* 62:5-14
- Jiménez-García, L.F., Fragoso-Soriano, R.J. 2000. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* 129: 218-222.

- Jordan, E. G., Timmis, J. N., y Trewavas, A.J. (1980) En Tolber, N.E (Ed), The Biochemistry of Plants. Academic Press, New York. pp. 489-588
- Lafontaine, J.G (1974) En Bush, H. (Ed), The Cell Nucleus. Academic Press, New York. pp. 149-185
- Marti, O., Drake, B., Hansma, P.K. 1987. Atomic force microscopy. Appl. Phys. Lett. 51, 484
- Maas, P. J.M. y. Rübsamen, T. 1986. Triuridaceae. Fl. Netrop 40: 1-55.
- Márquez-Guzmán, J., Engleman, M., Martínez-Mena,A., Martínez E., Ramos, C.H. 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Ann. Miss. Bot. Gard. 76: 124-127.
- Márquez-Guzmán, J., Vazquez-Santana, S., Engleman, M., Martínez-Mena, A., Martínez, E. 1993. Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Ann. Miss. Bot. Gard. 80: 891-897.
- Martínez, E. y Ramos, C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. Ann. Miss. Bot. Gard. 76: 128-135.
- May, R.M. 1989. How many species are there on Earth? Science. 241: 1441-1448.
- McClelland, G.M., Erlandsson, R. Chiang, S. 1987. In Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation, vol. 6B Eds D. O.Thompson, D.E Chimenti. Plenum, New York.307.
- Medina, M.A., Moreno-Díaz de la Espina, S., Fernández-Gómez,M.E., 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. Biol. Cell 67: 331-339.
- Nagl, W. 1985 Chromatin organization and the control of gene activity. Int. Rev. Cytol. 94, 21-56.
- Ohmi, T., Miyashita, M., Itano, M., Imaoka, T., y Kawanabe, I., 1992. IEEE Trans. Electron Devices ED-39 537.
- Palacios-Mayorga, S. y Pérez-Silva, E. 1993. Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae. A new saprophytic angiospermae family. Rev.Lat-Amer. Microbiol. 35:65-69.

- Preston, F.W. 1962. The canonical distribution of commonness and rarity: Parts 1 y 2. *Ecology* 43:185-215,410-432.
- Preston, F.W. 1979. The invisible birds. *Ecology* 60: 451-454.
- Quate, C.F., 1994. The AFM as a tool for surface imaging. *Surf. Sci.* 299/300 980-995.
- Rabinowitz, D., Cairns, S., y Dillon, T. 1986. Seven kinds of rarity. En: Soulé, M.E. (Ed.) *Conservation Biology*. Sinauer, Sunderland, Mass. pp. 182-204.
- Ress, W. A., Keller, R. W., Vesenka, J. P., Yang, G., y Bustamante, C. 1993. Scanning force microscopy imagin of transcription complexes: evidence for DNA bending in open promoter and elongation complexes. *Science*. 260: 1646-49.
- Reyes-García A.y Sousa-S. M.1995 Una nueva localidad para la familia Lacandoniaceae y nuevos registros para la Reserva Montes Azules, Chiapas, México. *Bol. Soc. Bot. Mex.*
- Reynoso-Robles, R. 1996. Ultraestructura del citoplasma de *Lacandonia schismatica*. Tesis Biología, Fac. Ciencias, UNAM, México.
- Rugar D. y Hansma P.1990 Atomic force microscopy. *Physics Today* 23-30 Oct.
- Rzedowski, J. y Ezcurra, E. 1986. Una nueva especie de *Haplopappus* (Compositae) de las dunas del noroeste de Sonora. *Ciencia Interamericana* 26:16-18.
- Solbrig, O.T. 1991. Biodiversity, a review of the scientific issues and a proposal for a collaborative program of research. *MAB Digest* 9, UNESCO
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., y Aebi, U. 1999. The nuclear pore complex: From molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 391-401.
- Stroschio J. A. y Kaiser W. J. 1993. *Scanning Tunneling Microscopy*. *Meth Exp. Phys.* Vol. 27. pp.459 Academic Press, USA.
- ThermoMicroscopes. *A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy*. Copyright 1993-2000 www. Park.com.

- Tomlinson, P.B. 1982. Helobiae (Alismatidae). En: Anatomy of Monocotyledons. Medcalfe, Vol 7, Clarendon Press, Oxford.
- Valenzuela Benavides, J. 1998 "Scanning Tunneling Microscopy: Methods and applications" En: 14 Th International Congress on Electron Microscopy.
- Vázquez-Santana, S. 1992. Estudio estructural e histoquímico de *Lacandonia cismática*. E. Martínez Ramos C.H (Lacandoniaceae), Familia, Género y Especie, nuevos para la ciencia. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias , UNAM, México.
- Vázquez-Santana, S., Engleman, M., Martínez-Mena, A., y Márquez-Guzmán, J. 1998. Ovule and seed development of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Am. J. Bot. 85: 299-304.
- Wachtler, F., y Stahl, A. 1993. The nucleolus: A structural and functional interpretation. Micron 24: 473-505.