



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio del Núcleo Interfásico de *Soridium spruceanum* Miers por Microscopía de Luz,
Electrónica y de Fuerza Atómica

T E S I S

para obtener el título de

BIÓLOGO

P r e s e n t a

Alma Leticia Zamora Cura

Directora de Tesis: Dra. María de Lourdes Segura Valdez



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del Alumno Zamora Cura Alma Leticia 56188223 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 097211785</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. María del Lourdes Segura Valdez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. Marco Antonio González Jiménez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Estudio del Núcleo Interfásico de <i>Soridium spruceanum</i> Miers por Microscopía de Luz, Electrónica y de Fuerza Atómica 42 p 2006</p>

Esta tesis se elaboró en el Laboratorio de Nanobiología Celular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Segura Valdez. Contó con el apoyo de los proyectos DGAPA-UNAM PAPIIT IN221202 y DGAPA-UNAM PAPIIT IN215106-3, incluyendo una beca para desarrollar tesis de licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lourdes Segura, quien ha tenido la paciencia y la amabilidad de compartir sus conocimientos y experiencias conmigo para poder llevar cabo este trabajo de tesis.

Al Dr. Luis Felipe, quien con su entusiasmo por el estudio del núcleo celular, me hizo decidirme a estudiarlo y comprenderlo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, quienes fueron parte importante en mi desarrollo como estudiante, ya que me ayudaron y orientaron cuando lo necesite.

A mis padres, que siempre me han apoyado, por su cariño y porque me enseñaron que la perseverancia y el amor de los que te rodean son indispensables para convertir tus sueños en realidad.

A mí querido hermano Carlos, que ha sido un ejemplo, un amigo y una guía en mi vida personal y académica.

A Paul, porque llegaste a mi vida, iluminándola y dándole sentido a todo lo que hay y habrá en ella. Te amo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción. Núcleo celular y Microscopía de Fuerza Atómica.....	2
1. Microscopía de Luz.....	5
2. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	6
3. Microscopía de campo cercano.....	7
3.1 Microscopía de Efecto túnel.....	8
3.2 Microscopía de Fuerza atómica.....	9
4. Orden Triuridales.....	12
4.1 Familia Triuridaceae.....	14
4.2 <i>Soridium spruceanum</i> Miers.....	15
5. Biología Celular del núcleo del Orden Triuridales.....	17
Objetivos.....	19
Metodología.....	20
Resultados	23
Discusión.....	33
Conclusiones.....	35
Referencias bibliográficas.....	37

RESUMEN

El orden Triuridales comprende a las familias Triuridaceae y Lacandoniaceae. *Soridium spruceanum* Miers, especie ubicada en la familia Triuridaceae, tribu Sciaphileae, es la única especie en su género y esta cercanamente relacionada a *Lacandonia schismatica*. Debido a que la población de *S. spruceanum* (Trans. Linn. Soc. 21: 50. 1852; Martínez S., et. al. 23128-A, MEXU) esta restringida a territorios de Centroamérica, como Guatemala y a su forma de vida saprofítica, había sido difícil estudiarla, y más aún, desde un punto de vista ultraestructural.

El objetivo general de este trabajo fue describir la morfología del núcleo celular interfásico de los botones florales de *S. spruceanum* mediante Microscopía de luz, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, sus siglas en inglés) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, sus siglas en inglés). Para esto se procesaron muestras de ovario y tépalo de *S. spruceanum*, con las técnicas convencionales para TEM con inclusión en epón obteniéndose tanto cortes semifinos como ultrafinos para ser analizados con los diferentes microscopios.

Los cortes semifinos, se montaron sobre portaobjetos limpios, se contrastaron con azul de toluidina, se usaron para Microscopía de luz y AFM. Los cortes ultrafinos de ovario de *S. spruceanum*, se montaron sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar, se contrastaron con la técnica convencional con acetato de uranilo y citrato de plomo (Ur-Pb) y se observaron con el TEM.

Las observaciones realizadas con los tres tipos de microscopios se registraron digitalmente para ser analizadas y comparadas entre sí. En primer lugar se puede afirmar que fue posible el describir la estructura general del núcleo interfásico de *S. spruceanum* por las tres microscopías y el utilizar al AFM como una nueva y novedosa herramienta para realizar estudios más dinámicos en muestras biológicas.

Las estructuras celulares observadas en las muestras analizadas de *S. spruceanum* son muy similares a las observadas en otros especímenes de este Orden, es decir, células poliédricas, citoplasmas ocupados en mayor medida por vacuolas, algunos organelos en las áreas citoplásmicas y núcleos generalmente redondeados con cromatina reticulada, nucléolos conspicuos, además de la presencia de los gránulos de gránulos de Lacandonia en el espacio intercromatiniano demostrada por TEM y por AFM.

INTRODUCCIÓN.

NÚCLEO CELULAR Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

La presencia de núcleo es la principal característica que distingue a una célula eucarionte de una procarionte. Por ser el lugar de almacenamiento del genoma, el núcleo sirve tanto como depósito de la información genética, como también centro de control de la célula. Se puede definir como un compartimiento celular limitado por una doble membrana interrumpida por poros (Jiménez, 2003), donde se efectúan los procesos relacionados con la expresión genética tales como la duplicación del DNA, la transcripción y el procesamiento del RNA, con excepción de la etapa final de la traducción, que se localiza en el citoplasma (Cooper, 2004).

El núcleo como lugar de almacenamiento de la información genética, tiene una particular morfología (Fig. 1). El *nucleoplasma* es la parte interna donde los solutos del núcleo están disueltos, el cual está contenido por una *envoltura nuclear* que forma un enlace entre el núcleo y el citoplasma. Dentro de un núcleo interfásico típico (no mitótico), se observan los cromosomas, que están muy compactados por fibras de nucleoproteínas, a esta organización la llamamos *cromatina*. También observamos de uno o más *nucleólos*, que son estructuras electrón-densas de forma irregular, donde se lleva a cabo la síntesis ribosomal y el ensamblado del ribosomas. Por último, esta la *matriz nuclear*, que es una red de proteínas fibrilares que da sostén al núcleo, además de servir como una “carretera” para guiar a los componentes internos del núcleo en los distintos procesos que llevan a cabo dentro de el. (Karp, 2005)

El estudio del núcleo celular interfásico ha sido abordado con microscopía de luz y de manera muy importante, mediante el uso de técnicas ultraestructurales con microscopía electrónica de transmisión. En la actualidad, la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una novedosa y poderosa herramienta para el estudio de la organización celular y tisular “*in situ*”, y por lo tanto, por la escala de las dimensiones de su estructura interna, para el núcleo. El AFM nos puede proporcionar información adicional a la que nos brinda el microscopio electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), ya que es un instrumento con el que se obtiene información de la superficie de una muestra en la escala nanométrica, operando tanto en medio líquido como en aire. Gracias a este tipo de microscopios ha sido posible obtener imágenes de

moléculas biológicas en amortiguadores acuosos, es decir, bajo condiciones estrictas de su ambiente natural (Birdi, 2003).

Con el AFM, el campo visual seleccionado puede variar de escalas atómicas a moleculares, tan grandes como 125 μm . También puede recorrer superficies rugosas en un rango vertical entre 8-10 μm . Comparado con esto, el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, sus siglas en inglés), el AFM provee un contraste topográfico superior, además las características de la superficie nos brindan información cuantitativa de la altura de la muestra. Mientras que comparado con el TEM, el AFM con alta resolución de las imágenes 3D se pueden obtener sin una preparación demasiado complicada, además te proporciona información a partir de los perfiles en 2D, obtenidos de muestras de corte transversal. De esta manera, interpretar las imágenes obtenidas para tener una visión integral de las estructuras observadas (Birdi, 2003).

Por este motivo el AFM, se ha venido usando como una herramienta novedosa en el estudio de estructuras celulares en los últimos años, tanto en trabajos de tesis (licenciatura y maestría), como en artículos publicados en revistas de gran prestigio en el campo de la Microscopía, a nivel mundial. La perspectiva de este instrumento es poder llegar a hacer observaciones de moléculas interactuando entre si, o en procesos internos de la célula en tiempo real, ya que el AFM tiene la opción de trabajar las muestras en medio líquido con características similares al medio intracelular en condiciones normales.

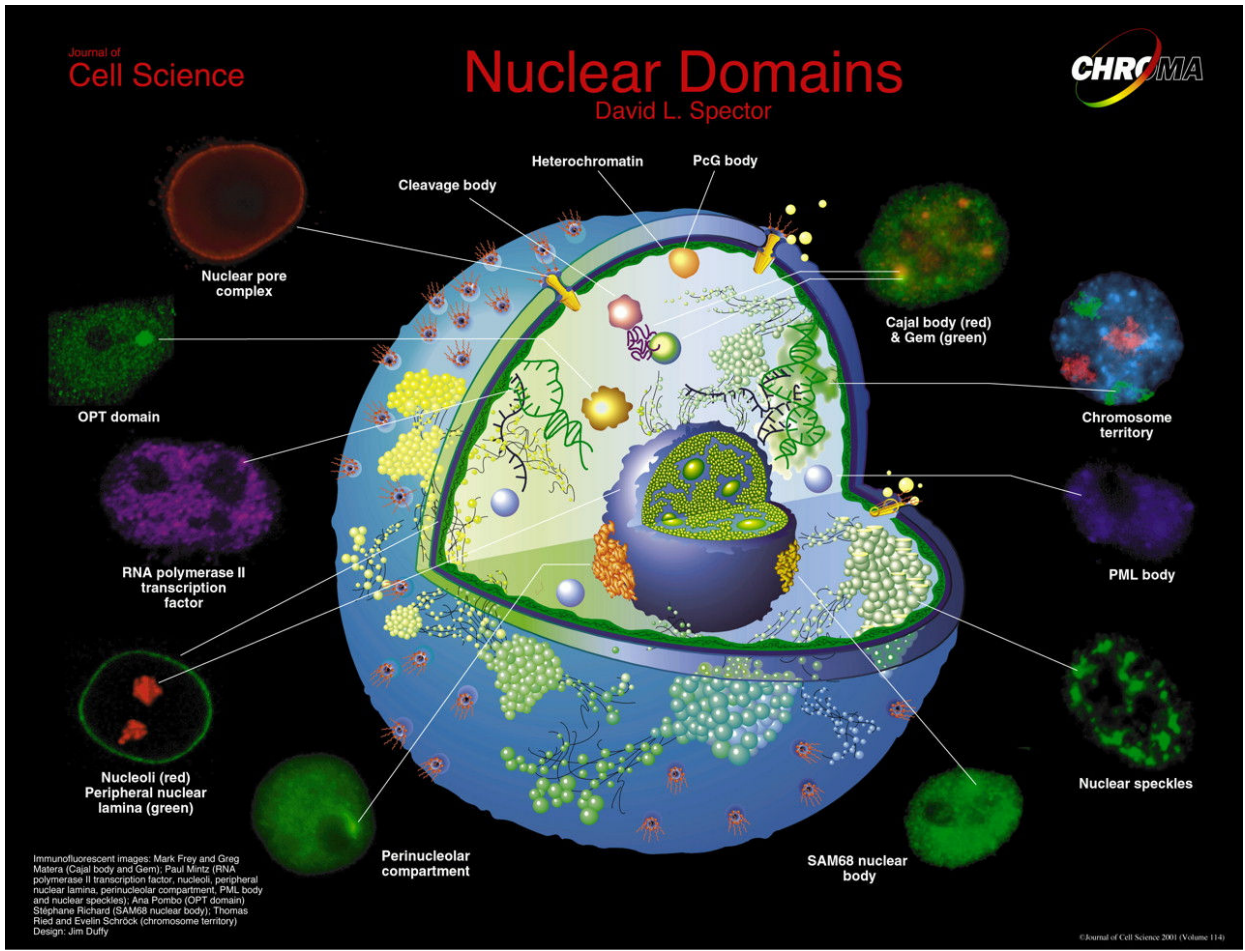


Fig. 1 Estructura del Núcleo Celular. Tomado de Journal of Cell Science 114, 2891-2893 (2001), Spector D.

1. MICROSCOPIA DE LUZ

Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser vistas a simple vista, el estudio de estas depende enormemente del uso de microscopios. De hecho, varios descubrimientos relacionados con la célula, han sido posibles debido al desarrollo y mejoramiento de microscopios, por ese motivo, la microscopía ha sido una herramienta muy útil en el estudio de especímenes biológicos (Cooper, 2004).

El tipo de microscopio más utilizado es el microscopio óptico o de luz (ML), que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. Por lo general, se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto más de 2.000 veces. El aumento total del microscopio depende de las distancias focales de los dos sistemas de lentes.

El equipamiento adicional de un microscopio consta de un armazón con un soporte que sostiene el material examinado y de un mecanismo que permite acercar y alejar el tubo para enfocar la muestra. Los especímenes o muestras que se examinan con un microscopio son transparentes y se observan con una luz que los atraviesa; se suelen colocar sobre un rectángulo fino de vidrio. El soporte tiene un orificio por el que pasa la luz. Bajo el soporte se encuentra un espejo que refleja la luz para que atraviese el espécimen. El microscopio puede contar con una fuente de luz eléctrica que dirige la luz a través de la muestra (Fig. 2).

La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible que es aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$. Esta limitante teórica está determinada por dos factores – la longitud de onda (λ) de luz visible y poder de aumento de luz de las lentes del microscopio, es decir, la apertura numérica (Copper, 2004).

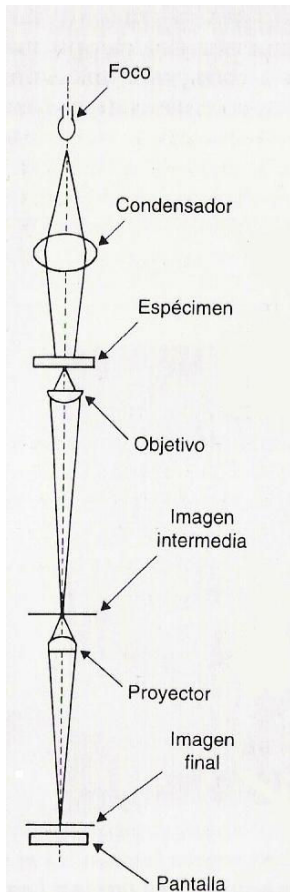


Fig. 2 Esquema del Microscopio de Luz. Tomado de Vázquez Nin y Echeverría, 2000.

2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Debido a la limitada resolución del Microscopio de Luz, para el análisis detallado de la estructura celular se requiere el uso de un microscopio más poderoso. El Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) es un instrumento que utiliza un haz de electrones acelerados que irradia y atraviesa una muestra, dándonos una imagen formada tanto por los electrones que son desviados por los átomos de la muestra como por los que no son desviados. Además, los TEM actuales tienen un poder de resolución de entre 0.15 y 0.25 nm, que es 1000 veces mayor que el del microscopio de luz (Vázquez-Nin, 2000).

Los microscopios electrónicos son instrumentos del siglo XX. Los avances teóricos de DeBroglie, sobre las propiedades ondulatorias de un haz de electrones acelerados, propició que dos años más tarde, los experimentos de Busch lo llevarán a la creación de

los lentes que son usados en este tipo de microscopios hasta nuestros días (Vázquez-Nin, 2000).

Las principales partes que constituyen un TEM son: el cañón electrónico, la columna en la que se encuentran ubicadas las diferentes lentes electromagnéticas, un sistema de vacío y un sistema de enfriamiento además del sistema electrónico que controla el funcionamiento del microscopio (Vazquez-Nin, 2000). La Microscopia Electrónica de Transmisión, ha sido ampliamente usada para el estudio de especímenes biológicos desde hace años. Este microscopio nos da una imagen bidimensional de nuestra muestra, la cual puede ser analizada por diversos métodos para obtener información específica de la misma (Fig. 3).

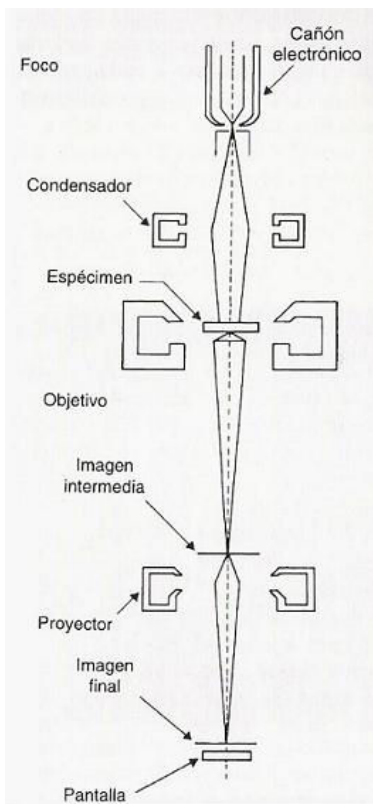


Fig. 3 Esquema del Microscopio Electrónico de Transmisión.

3. MICROSCOPIA DE CAMPO CERCANO

Los microscopios ópticos de campo cercano permiten una imagen óptica en una escala de 100 nm por barrido a un tamaño nanométrico, a una cercanía entre 5 – 10 nm sobre la superficie de investigación. El principio de un Microscopio de campo cercano, puede verse de la siguiente manera:

- *Una punta (Sensor óptico)*
- *Una muestra*
- *Una superficie base*

Una ventaja de usar este tipo de microscopios es la información espectral inherente, que permite ver una imagen de la superficie. El limitar la luz con baja longitud de onda de dispersión, es un factor importante en la resolución de la imagen, más allá del límite de difracción posible (Birdi, 2003).

Los avances en este campo se han hecho solamente en los últimos cincuenta años, este concepto de microscopios con superresolución en el campo cercano, ha sido demostrado gracias a la realización de experimentos que lo comprueban. (Birdi, 2003)

Los microscopios que se han desarrollado a partir del desarrollo conceptual de la microscopía de campo cercano, han sido el Microscopio de Efecto Túnel y el AFM.

3.1 Microscopía de Efecto Túnel

Por muchos años, los investigadores se han esforzado en combinar la alta resolución proporcionada por el TEM, con la capacidad de operación en medio líquido del Microscopio de Luz (Bustamente y Keller, 1995). En el artículo *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy* (Binnig, 1982), se demostró una resolución sin precedente del Microscopio de Efecto Túnel. El principio de este microscopio es sencillo; esencialmente, una punta de metal barre sobre una superficie a una corriente de túnel constante. El desplazamiento de esta punta es proporcionado por un voltaje aplicado, entonces el rendimiento de este, da una imagen topográfica de la superficie (Binnig, et. al., 1982). La resolución del microscopio depende fuertemente de la corriente túnel y la

distancia entre los dos electrodos, y esta es de 0.1 nm en el plano perpendicular y 0.001 nm en la vertical (Fig. 4).

Para entender esto, es necesario definir que el **efecto túnel** como la capacidad que tienen las partículas subatómicas como los electrones para pasar una barrera de potencial sin tener energía suficiente para rebasarla. Este efecto solo se explica con la mecánica cuántica, donde la materia se comporta como onda o como partícula (dualidad onda-corpúsculo). Por esta razón, los electrones en lugar de ser reflejados de la superficie aislante, como se vería en al mecánica clásica, los electrones quedan alrededor de esta superficie, como si fueran una nube de electrones, y algunos de estos, tendrían la energía de atravesar la barrera aislante.

Este fenómeno físico es el principio en el que se basa el Microscopio de Efecto túnel o de Tunelamiento y la información que puede dar es acerca de la superficie, así como de su relieve, con una resolución de 0.1 nm en el plano perpendicular y 0.001 nm en la vertical.

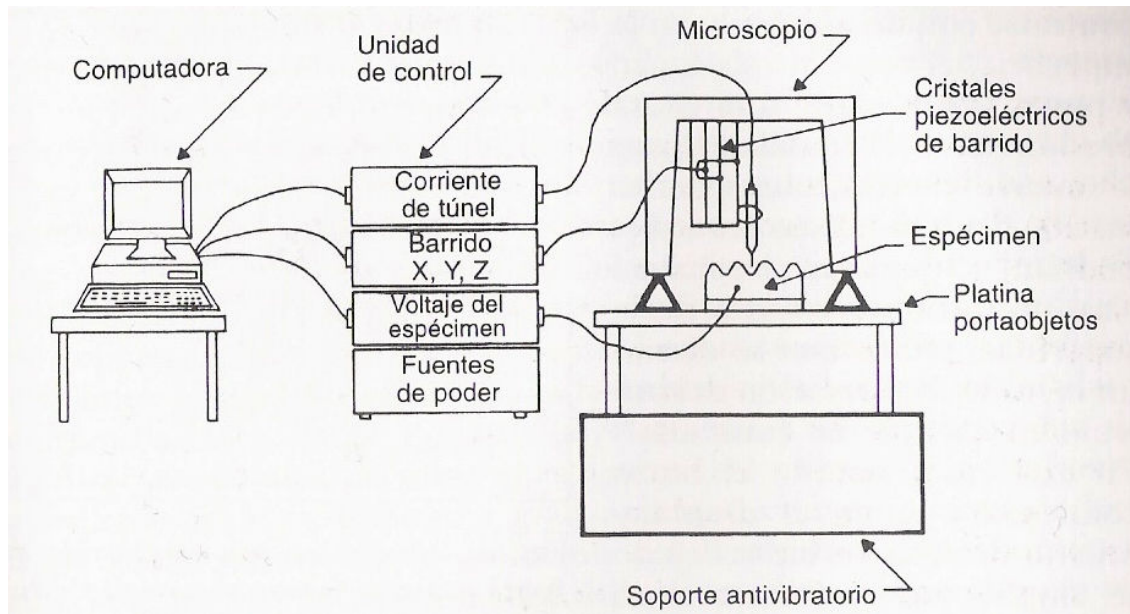


Fig. 4 Esquema del Microscopio de Efecto Túnel.

3.2 Microscopía de Fuerza Atómica

El Microscopio de Fuerza Atómica es muy similar al Microscopio de Efecto Túnel, pero en lugar de utilizar la diferencia de potencial, está en contacto directo con la muestra y detecta los efectos de las fuerzas atómicas. (Fig. 5)

Este instrumento fue propuesto como un nuevo recurso en la investigación de superficies por Binnig y Quate (1986), con el antecedente de que Binnig ya había trabajado en el Microscopio de Tunelamiento años atrás. Su resolución es parecida a la del anterior, pero tiene la ventaja de poder ser utilizado para observar muestras no conductoras, como las biológicas. Modulando el voltaje que llega a la punta, estos microscopios pueden no solo ver átomos, sino moverlos, colocarlos y manipularlos, en una muestra en seco, así como en muestras biológicas en medio acuoso. Esto implica un mayor campo de experimentación. Aunado a esto, el software que viene incluido en estos equipos, ayuda a un mejor manejo del procesamiento de imágenes, para que las imágenes obtenidas, puedan ser vistas también en su forma tridimensional, puesto que puedes observar imágenes tridimensionales sin una preparación especial de la muestra, la cual te da una información más completa que la obtenida con una imagen bidimensional (Braga y Ricci, 2004)

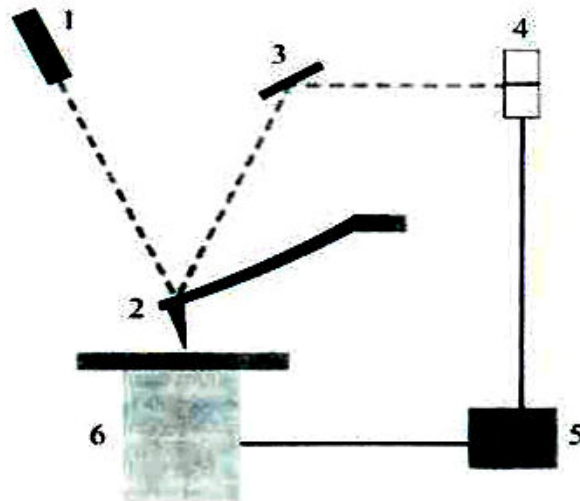


Figura 5. Diagrama esquemático del escaneo de una muestra en el AFM. 1. Láser; 2. Cantilever; 3. Espejo; 4. Fotodetector de posición; 5. Componentes electrónicos; y 6. Escáner con muestra

En este microscopio se dispone de una punta tan afilada que su extremo está compuesto por un solo átomo. Por ella fluye una débil corriente eléctrica. Esta se aproxima al material que se va a estudiar hasta situarse a menos de un nanómetro (millonésima de metro) de distancia, manteniendo con la muestra una diferencia de potencial de 1 voltio. La punta recorre la superficie de la muestra y mientras esto ocurre, la punta hace contacto físico sobre dicha superficie “barriéndola”, en el modo de Contacto o moviéndose hacia arriba o hacia abajo, tocando solo de de manera intermitente la superficie, en el modo de “Tapping”. En ambos modos de trabajo, la punta sufre inflexiones que son registradas por una computadora que mediante un software se reproduce la topografía atómica de la muestra (Figura 6).

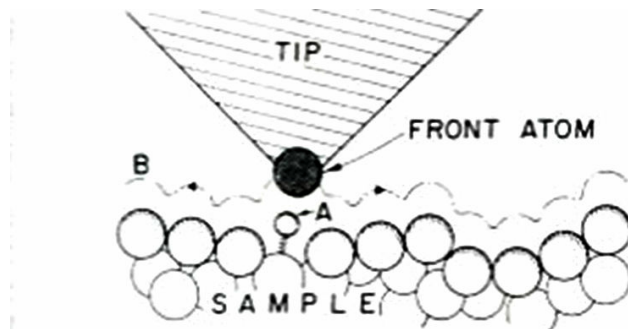


Figura 6. Descripción del principio de operación de un AFM. La punta sigue el contorno de la muestra B, manteniendo una fuerza constante entre la muestra y la punta. En AFM, la muestra y la punta son aislantes o conductoras. En el caso de un Microscopio de Tunelamiento, A varía la fuerza de posición en el enganche y es modulada por la corriente de tunelamiento.

4. ORDEN TRIURIDALES

Las angiospermas, o plantas con flores, es el mayor grupo existente de plantas con semilla (Burleigh y Mathews, 2004), además de contar con al menos 260000 especies vivas, clasificadas en 453 familias (APG II, 2003). Las angiospermas poseen una asombrosa diversidad química, reproductiva, morfológica, por tamaño de su genoma y su organización, que no tiene paralelo en el reino de las plantas.

Este grupo, se divide en dos: monocotiledóneas y dicotiledóneas. De estos, el grupo de las monocotiledóneas, es el de mayor radiación, que fue reconocido como grupo desde los estudios de la estructura de la semilla por John Ray (1703) en el siglo XVII. Este grupo, en los últimos años, ha sido drásticamente reorganizado debido a los resultados de los nuevos estudios basados en el DNA, como el realizado por Chase en el 2000.

De acuerdo con Cronquist (1988), las plantas con flores o Magnoliophyta, incluyen dos Clases que son Liliopsida y Magnoliopsida. La Clase Liliopsida a su vez incluye cuatro Subclases denominadas Alismatidae, Arecidae, Commelinidae, Zingiberidae y Liliidae. La Subclase Alismatidae comprende a su vez cuatro Órdenes: Alismatales, **Triuridales**, Hydrocharitales y Najadales (Figuras 5-7). Esto sugiere que las Triuridales se encuentran entre las monocotiledóneas más tempranamente divergentes

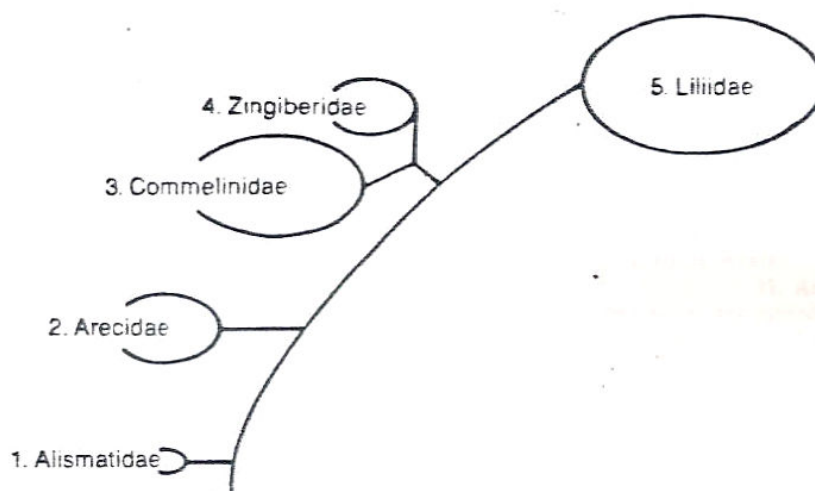


Fig. 5. Posibles relaciones filogenéticas entre las cinco subclases de la Clase Liliopsida (monocotiledóneas) (Cronquist, 1988).

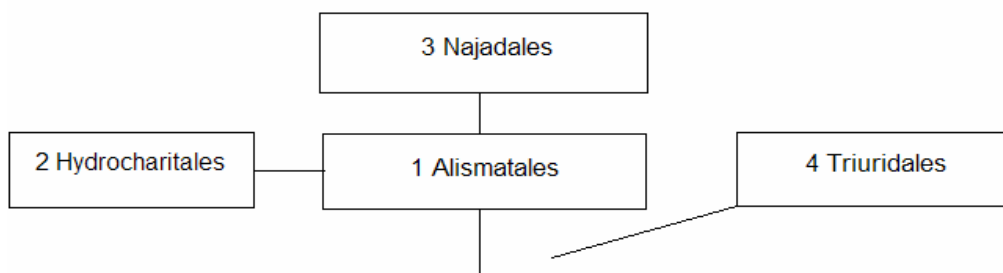


Fig. 6. Posibles relaciones filogenéticas entre los cuatro órdenes de la Subclase Alismatidae (Cronquist, 1988).

Triuridaceae

Triuris spp.

Sciaphila spp.

Peltophyllum spp.

Soridium spp.

Lacandoniaceae

Lacandonia schismatica

Fig. 7. Familias y Géneros del Orden Triuridales

El Orden **Triuridales**, pertenece al grupo de las monocotiledóneas, se caracteriza por presentar pequeñas hierbas saprófitas, micotróficas y sin clorofila. Hojas reducidas, alternando con escamas. Flores pequeñas, unisexuales, hipóginas o epíginas naciendo en la bráctea terminal del racimo o corimbo, o rara vez, uno a modo de cima, perianto de (3) 6 (10) tépalos en una serie sencilla o en dos series; los tépalos solitarios o connatos cerca de la base, no tienen pétalos. Gineceo de tres a muchos carpelos, éstos solitarios o connatos solo en la base; óvulo de uno a muchos en cada carpelo sobre una placenta basal o marginal. Fruto folicular con una a muchas semillas. Semillas con endospermo bien desarrollado (Dahlgren, 1985).

Dentro del Orden **Triuridales**, se encuentran la familia **Triuridaceae** y la familia **Lacandoniaceae**. La familia **Triuridaceae** incluye entre 7 y 9 géneros de hierbas sin clorofila, que viven en simbiosis con micorrizas (Gandolfo, 2002). Desde que la familia fue propuesta por Gardner en 1845, ha sido revisada en varias ocasiones, por ejemplo Mass (1986), Rübtsamen-Weustenfeld, (1991) y Martínez-Gómez (1994). Miers (1852) divide a la familia en dos tribus, Sciaphileae y Triurideae (*Triuris alata*, *Triuris brevistelis*), clasificación que se mantiene hasta nuestros días (Mass-van de Kamer, 1995). En la tribu Sciaphileae es donde se encuentra el género *Soridium* Miers 1852.

En la clasificación de "Flora de Guatemala" (1958) por ser un estudio específico de la parte central y sur de América, la familia Triuridaceae, está formada por 3 géneros:

Sciaphila, *Soridium* y *Triuris*. Mientras que la clasificación de la familia Triuridaceae, basada en los autores Rübtsamen-Weustenfeld (1991), mencionan cerca de 70-80 especies en 6-7 géneros en los trópicos de ambos hemisferios. Aunque existe una gran concentración en Asia, incluyendo India del este y Nueva Guinea, según Green y Solbrig (1966), en América central se encuentran 4 géneros: *Soridium*, *Triuris*, *Sciaphila* y *Peltrophyllum*.

4.1 Familia Triuridaceae

Los miembros de la familia **Triuridaceae** son hierbas saprofitas que tienen de 0-8 hojas alternas, similares a escamas. Sus inflorescencias son en forma de racimo terminal y bracteado. Pueden tener tres tipos de flor: flores unisexuales o bisexuales, blancas a rojas, con 3-6 tépalos valvados, persistentes y la parte basal tubular; flores bisexuales con 2-6 estambres libres y muchos ovarios libres; flores estaminadas con 2-6 estambres epitépalos, libres o sobre un andróforo central (*Triuris*); y flores pistiladas con 10 o más ovarios libres. El ovario es locular, con un estilo lateral o terminal (*Triuris*). El fruto es un aquenio o un folículo, con una semilla (Davidse, 1994).

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia Triuridaceae

Género: *Soridium*

Especie: *S. spruceanum* Miers

De acuerdo con Cronquist (Davidse, 1990), dicha familia se considera taxonómicamente aislada, además de su probable relación con la pequeña familia Petrosaviaceae, debido a su hábito saprófito, incluyendo la gran semejanza anatómica del tallo, raíz y hojas. Por otro lado, los carpelos separados y más o menos numerosos de la familia Triuridaceae la asocian con la subclase Alismatidae. Por estos motivos, Cronquist menciona textualmente que “eventualmente podría ser necesario constituir a Triuridales como una subclase distinta”.

Posteriormente, Martínez y Ramos (1989) incluyen una nueva familia en el orden Triuridales, Lacandoniaceae, la cual se encuentra formada por una sola especie, *Lacandonia schismatica*. Esta especie está colocada dentro de este orden por sus semejanzas con la familia Triuridaceae.

La familia **Lacandoniaceae** está emparentada con la familia **Triuridaceae** porque comparten los siguientes caracteres: gineceo apocárpico, óvulos anátropos, polen inaperturado, flores trímeras, tépalos con apéndices, hábito saprófito y micorrizas endotróficas. Pero difieren por la disposición de los órganos reproductores, ya que la anteras se encuentran en la parte central de la flor rodeada por numerosos pistilos, característica que hace única a *L. schismatica*, que fue colocada por un tiempo dentro de la familia Triuridaceae por sus semejanzas con esta (Martínez y Ramos, 1989).

Sin embargo, debido a nuevos estudios moleculares realizados por Chase (2004), donde basado en datos de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA, se ha llegado a proponer que la familia Triuridaceae se encuentra en el Orden Pandanales. Por lo que es más cercana a la familia Pandanaceae, Cyclanthaceae, además de otras familias que nunca habían sido relacionadas con este grupo, Velloziaceae y Stemonaceae. Aunque este estudio solo incluyó al género *Sciaphila* para representar a las Triuridaceae, por lo que este estudio no se puede considerar como decisivo para reorganizar a estas familias en un Orden distinto. Por lo tanto, la clasificación de estos grupos aun queda por definir y sigue en discusión.

4.2 *Soridium spreceanum* Miers

Por otro lado, una especie que aun no ha sido estudiada desde el punto de vista de estructura celular, como en el caso de especies del género *Triuris* y *Sciaphila*, ha sido ***Soridium spruceanum*** Miers (Trans. Linn. Soc. London 21: 50, 1852; Martínez S. *et al.* 23128-A, MEXU). Esta es una pequeña saprófita que posee raíces filiformes, pilosas, con rizoma horizontal y vertical, escamoso. Un tallo pardo claro, ramificado o simple, con hojas angostas triangulares, más abundantes en la parte baja del tallo. Son plantas monoicas que posee desde 7-20 flores unisexuales (en ocasiones raras se dan flores bisexuales) que son estaminadas en la parte superior de la inflorescencia. Sus tépalos que son entre 4 (-6), son papilosos en el haz. Los estambres subsésiles van desde 2-3 (-4) y 2 anteras son loculares con una dehiscencia transversal; mientras que los pistilos con los ovarios son papilosos. El fruto agregado en un poliarquenio, donde cada arquenio posee paredes gruesas, las semillas globosas y la testa finamente reticulada. Su polen es elipsoide y monocolpado (Fig. 8). Solo hay una especie en

América tropical, localizada en Guatemala, con mayor abundancia, hasta el Brasil amazónico.

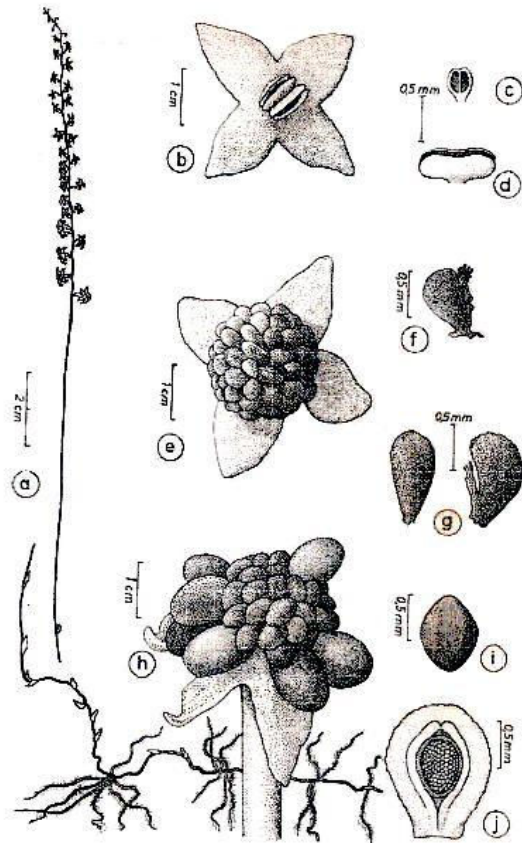


Fig. 8. *Soridium spruceanum* Miers (Tomado de: Maas & RübSamen, 1986). Ver descripción botánica en el texto.

Debido a que su población está restringida a estos territorios de Centroamérica y su forma de vida saprofítica, había sido difícil colectarla, para el estudio de la estructura y ultraestructura de su núcleo celular interfásico.

5. BIOLOGÍA CELULAR DEL NÚCLEO DEL ORDEN TRIURIDALES

Los géneros que han sido estudiados, a nivel ultraestructural principalmente han sido de la familia Triuridaceae: *Triuris* (*Triuris brevistylis*, *Triuris alata*) y *Sciaphila*, así como *Lacandonia schismatica*. El primer acercamiento al estudio de este grupo de plantas surge a raíz del descubrimiento de *L. schismatica* como nueva especie y propuesta de nueva familia. Un ejemplo de estos trabajos, es el de Agredano-Moreno, en 1991, quien estudió el núcleo interfásico de *L. schismatica* y *Triuris alata*. En este trabajo de tesis, se observó que el núcleo celular de ambas especies presenta la misma ultraestructura, aunque observándose partículas en los espacios intercromatinianos, no vistas antes en otra planta, los cuales fueron llamados gránulos de Lacandonia, que tienen un tamaño de alrededor de 30 nm. Posteriormente, la misma autora, siguió estudiando estos gránulos con técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas (Agredano-Moreno, 1993). Aunque esto había dejado de lado la ultraestructura del citoplasma de la misma *L. schismatica*.

Por otra parte, Rafael Reynoso Robles (1996), mediante estudios con TEM demostró la presencia de organelos tales como el Aparato de Golgi, Mitocondrias, Retículo Endoplásmico Rugoso, Vacuolas, estructuras semejantes a plastos en el citoplasma de las células de los tegumentos y del receptáculo floral de *L. schismatica*.

En el año 2001, Agredano-Moreno, continuo su estudio y caracterización de los gránulos de *lacandonia*, por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y aislamiento de una fracción enriquecida gránulos de Lacandonia, donde se concluyó que estos gránulos poseen características citoquímicas similares a los gránulos pericromatinianos que poseen células animales, y gránulos de los anillos de Balbiani, presentes en insectos. Además que no son privativos de esta planta, ya que aparecen en otras que incluso son gimnospermas, como *Ginkgo biloba*.

Hasta este momento, la mayoría de los estudios realizados en estas especies, se habían realizado con Microscopía de luz y en mayor medida con TEM. Sin embargo, la AFM ya se comenzaba a emplear como herramienta en el estudio de estructuras celulares.

Un ejemplo de ello es el artículo publicado en el Boletín de la Sociedad Botánica de México 62:5-14 (1998), donde se hizo un análisis por TEM y AFM (Jiménez-García et. al. 1998)

En un trabajo posterior de uno de los autores de este artículo (Fragoso, 2000), se realiza un estudio detallado de la estructura celular de *L. schismatica* por AFM. En las imágenes mostradas en este trabajo, solo se pueden apreciar algunos elementos tisulares y celulares bien definidos, como son el saco embrionario y las células del tegumento. Así como el núcleo, nucléolo, cromatina compacta, vacuola y pared celular. Esto se debe en gran medida a la gran vacuola que posee la célula, y el espacio tan limitado donde se restringe el citoplasma.

S. spruceanum, no había sido estudiada anteriormente, porque no había existido la oportunidad de colectarla, procesarla para TEM y para AFM; a pesar de que también pertenece a la familia Triuridaceae, en la cual están incluidas *Triuris brevistylis* y *Triuris alata*, y en donde ha sido posible ver partículas ribonucleoproteicas de 32nm, los llamados gránulos de Lacandonia, que fueron vistas por primera vez en *Lacandonia schismatica* (2000).

Estas partículas, ya han sido estudiadas por Agredano- Moreno (1991-1993) y encontrado que estas estructuras RNP están involucradas en la transcripción del RNA y su procesamiento, además de demostrar que tienen características estructurales y histoquímicas similares a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani.

En los últimos estudios, también se ha trabajado con especies de gimnospermas tempranamente divergentes, como *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez, et. al., 2002) y el *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete). En los cuales, también se han observado, estas partículas RNP's, aunque en menos cantidad, lo cual puede indicar que hay una relación evolutiva en la presencia de estas estructuras.

El interés de *S. spruceanum* es el de completar los estudios realizados relacionados con el tipo estructura celular de los miembros pertenecientes al orden Triuridales y el interés particular de observar en el núcleo de *S. spruceanum*, la presencia de gránulos de Lacandonia que ya habían sido observados en los otros ejemplares. Hasta ahora se tiene la oportunidad de conocer la estructura celular de esta planta, aunque en esta ocasión no solo con Microscopia de luz y TEM, sino también por AFM, la cual tiene un gran futuro en la investigación biológica, debido a la posibilidad de obtener imágenes de dimensiones atómicas y de trabajar muestras biológicas en seco y en soluciones fisiológicas.

OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Describir la morfología del núcleo celular interfásico de los botones florales de *Soridium spruceanum* Miers mediante Microscopía de luz, Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía de Fuerza Atómica

PARTICULARES

- ❖ Describir la morfología general del núcleo interfásico de *S. spruceanum* mediante Microscopía de luz con campo claro.
- ❖ Describir la ultraestructura del núcleo interfásico de *S. spruceanum*, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión convencional.
 - Detectar la presencia de los gránulos de Lacandonia en los núcleos interfásicos de *S. spruceanum* con Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía de Fuerza Atómica
- ❖ Comparar la información obtenida, sobre la estructura de los núcleos interfásicos de *S. spruceanum*, mediante los tres tipos de microscopía mencionados.

METODOLOGÍA

MUESTRAS BIOLÓGICAS. Se procesaron fragmentos de botones florales de *Soridium spruceanum* Miers, colectados y proporcionados por el Biólogo Esteban Martínez, del Instituto de Biología de la UNAM.

MICROSCOPIA DE LUZ. De los bloques obtenidos a partir del procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión, se realizaron por cortes semifinos de 150 y 100 nm de grosor, del botón floral del ovario de *S. spruceanum*, utilizando el ultramicrotomo Leica modelo Ultracut, los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina para verificar la conservación de las muestras y para analizarlas con un microscopio de luz de la marca Nikon, modelo E-800, con registro digital. Una vez hecho esto, se obtuvieron cortes semifinos nuevos para ser observados con el microscopio de fuerza atómica y se seleccionaron las zonas para la obtención de cortes ultrafinos.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN. Se fijaron botones florales con una mezcla de Glutaraldehído al 6% en buffer de fosfatos PBS aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres enjuagues de diez minutos cada uno, en buffer PBS. Al finalizar los enjuagues se hizo una post-fijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% por 16 horas a temperatura ambiente.

Los fragmentos del espécimen se deshidrataron en alcoholes graduales de 50%, 70%, 80%, 90%, 96% durante diez minutos cada uno. Finalmente, con alcohol al 100% (alcohol absoluto) se realizaron tres cambios de cinco minutos cada uno.

Con el fin de concluir la deshidratación y preparar la muestra para la inclusión, al final de la deshidratación, se hicieron tres cambios con el agente intermediario Oxido de propileno ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) de 5 minutos cada uno. Para finalizar, las muestras se colocaron en la mezcla de preinclusión, es decir, una solución homogénea de Oxido de propileno/resina epóxica en una proporción 1:1 por 16 horas. La inclusión se llevó a cabo en la mezcla de resina epóxica al 100% que se polimerizó en la estufa a 60° C durante 24 horas.

Los cortes ultrafinos de entre 60 y 90 nm se montaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar y se contrastaron con la técnica convencional de contraste para Microscopía Electrónica de Transmisión con acetato de uranilo y citrato de plomo (Ur-

Pb). Esta consiste en colocar una gota de acetato de uranilo (Ur) en una cámara húmeda y oscura. Por medio de flotación, se colocara la rejilla en la gota durante 20 minutos. Al finalizar el tiempo, se enjuagó con agua bidestilada y con un filtro, para evitar contaminación. Después, se colocó una gota de citrato de plomo en la otra cámara húmeda (no necesariamente oscura) y con un poco de hidróxido de sodio, con el fin de evitar la precipitación del plomo en la rejilla. Del mismo modo que se hizo con el acetato de uranilo, la rejilla se contrastará por flotación durante 10 minutos. Al final se vuelve a enjuagar la rejilla con agua bidestilada. (Ver diagrama de flujo)

Al final del procesamiento, se realizaron observaciones en un Microscopio Electrónico de Transmisión de la marca Jeol modelo 1010 a 80 kV.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. El Microscopio de Fuerza Atómica que se utilizó en las observaciones de los cortes semifinos, fue de la marca Digital Instruments modelo Bioscope, montado sobre un Microscopio de Luz, con el fin de ubicar en el portaobjetos el tejido de interés de este estudio. Algunos cortes semifinos observados con el Microscopio de Fuerza Atómica no fueron expuestos ni al colorante ni al calor para el secado, con la intención de evitar posibles deformaciones en el tejido debido al calor con el que se secan al realizar la tinción con azul de toluidina. Mientras que otros, en los que sí se uso la tinción con el azul de toluidina, solo se usaron solo para ubicar zonas que pudieran ser de interés para el estudio.

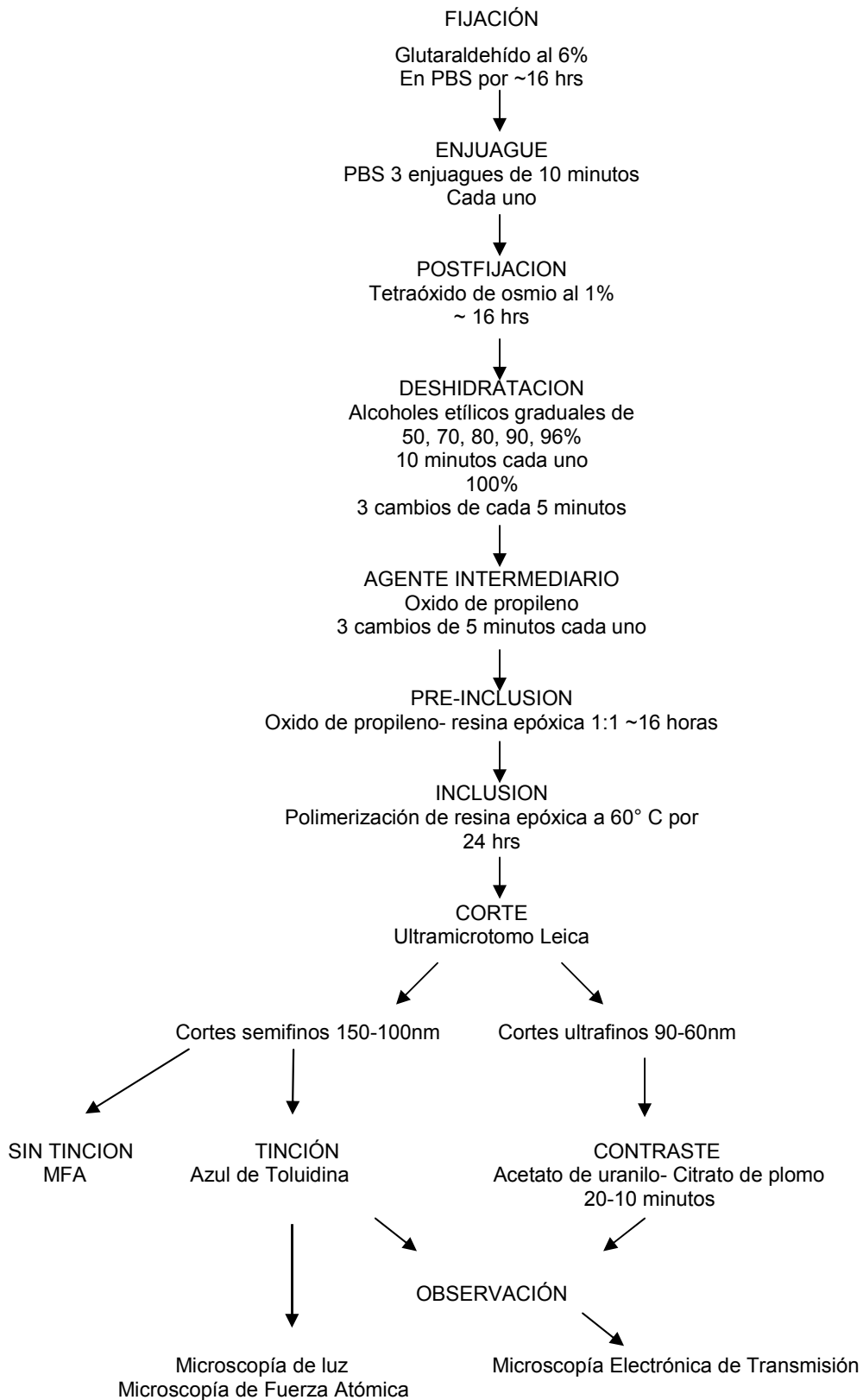


Diagrama de flujo del procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión y de fuerza atómica, seguido en este trabajo

RESULTADOS

Se procesaron muestras de botones florales de *S. spruceanum* para realizar las observaciones en tipos celulares similares a los explorados en *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistyis*, especies representantes también del orden Triuridales. Las plantas, donadas por el Biólogo Esteban Martínez, se muestran en la figura 9

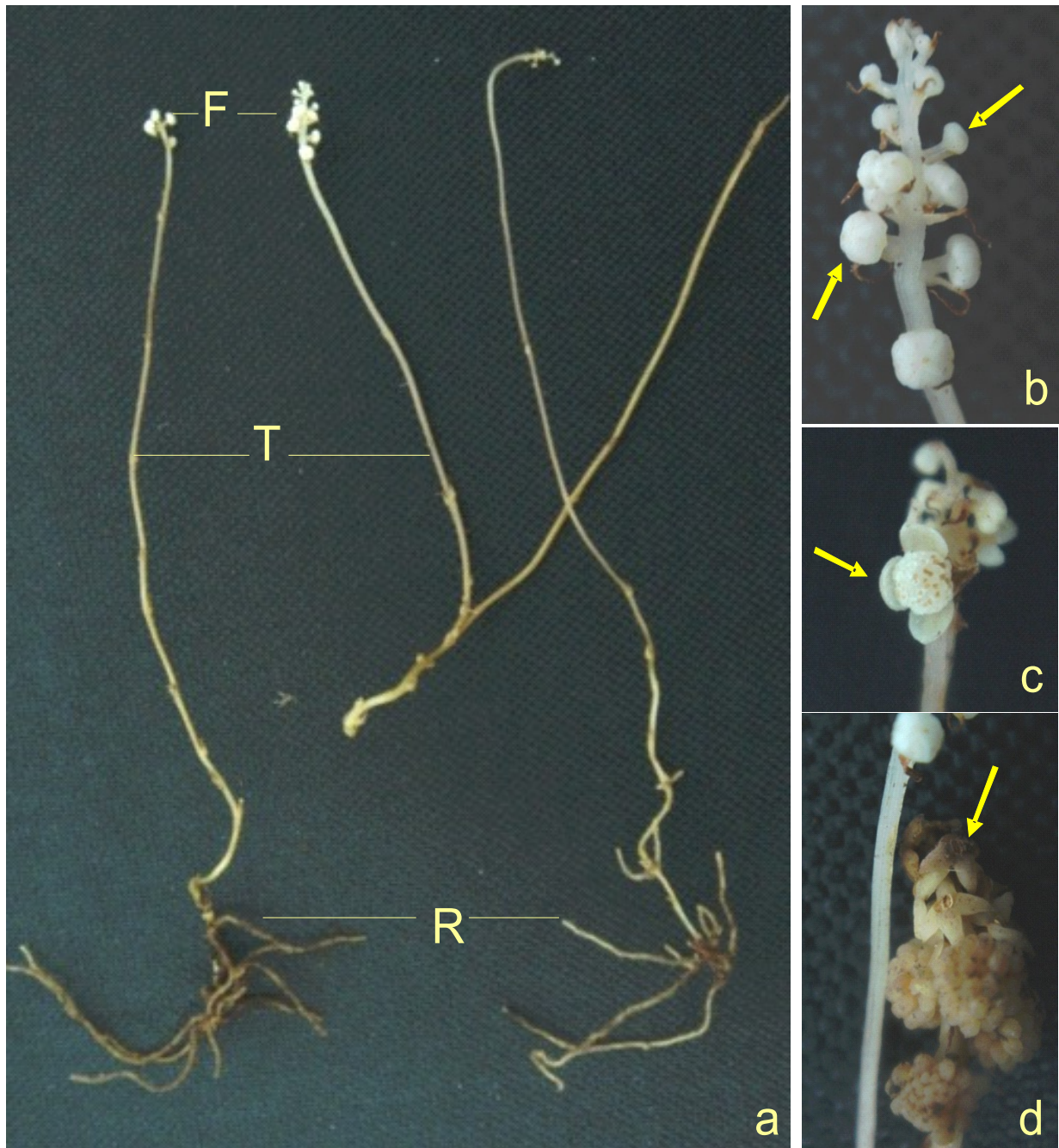


Fig. 9. Ejemplares de *S. spruceanum* utilizados en este trabajo. a), ejemplares de plantas completas (R, raíz; T, tallo; F, flores; b) botones florales, flechas; c-d), flores, flechas

De las observaciones realizadas a través de los distintos Microscopios, se obtuvieron imágenes de estructuras celulares como Mitocondrias, Vacuolas, Retículo Endoplásmico Rugoso, Ribosomas y Plastos. Estas estructuras son evidentes en los tres microscopios, lo que demuestra que si es posible observar estructuras celulares en el AFM, de igual calidad que el Microscopio de Luz, y que es posible llegar a resoluciones iguales o mayores que el TEM.

Hasta ahora, el TEM nos dio imágenes de mayor aumento y con más información, puesto que si se pudieron ver estructuras a más aumento, como la mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, y con mayor detalle la envoltura nuclear, y el nucléolo junto al componente fibrilar denso y componente granular. Aunque, solo llega hasta determinada resolución, porque a aumentos altos, se necesita usar mayor intensidad del haz de electrones, lo que provoca que la muestra se sublime, por esta razón, no se pueden obtener imágenes de estructuras a nivel atómico. Estas observaciones, generaron imágenes de estructuras celulares (mitocondrias, RER, vacuolas, ribosomas, plastos), además de estructuras nucleares (núcleolo y sus tres regiones, gránulos de Lacandonia, cromatina). Mientras que en AFM, aún es difícil definir estructuras como el RER y ribosomas, es posible observar estructuras nucleares en los espacios inter y pericromatinianos de un tamaño de 30 nm, que están en el rango de los gránulos de Lacandonia, aunque aun falta por definirlos como tal.

En la figura 10, por ejemplo, se pueden apreciar elementos celulares generales, como son vacuola, núcleo, citoplasma muy reducido, y probablemente algunos plastos adheridos a la pared celular. La vacuola, la cual ocupa la mayor parte de la célula, deja restringidos a los demás elementos celulares en una zona muy limitada y esto solo puede apreciarse en grandes aumentos en el TEM. Además, gracias a la pared celular, es posible definir los límites de cada célula, como se ve en cada una de las imágenes (Fig. 10). Esto facilita de gran manera el estudio de este tipo de célula en el AFM, ya que como este trabaja barriendo con una punta estructuras con bordes pronunciados o de forma granular, el tejido necesita ser procesado para que este sea relativamente duro, de esta forma los contornos de la célula y sus elementos se ven bien definidos. La superficie del corte refleja tienen una textura que da la estructura celular, por este motivo el tejido no necesita ser sometido a tinciones, que en otros microscopios, es indispensable para hacer observaciones, como en el TEM, donde las muestras tienen que ser contrastadas con Ur-Pb, o en el caso de la Microscopía de Luz, donde se necesita para ver la estructura general de la célula, una tinción con azul de toluidina.

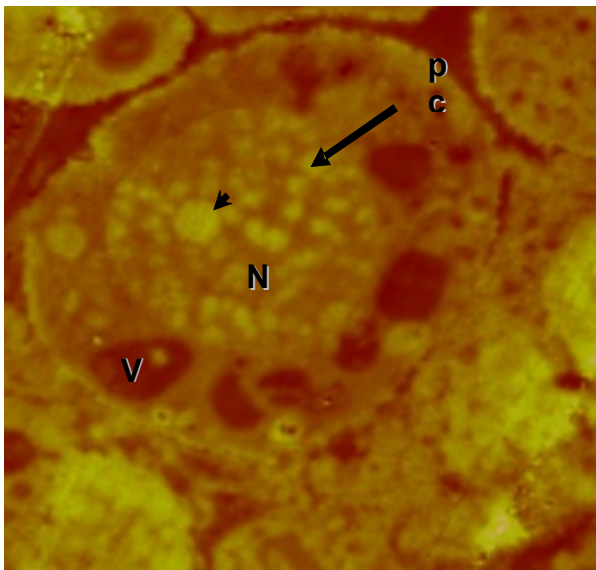
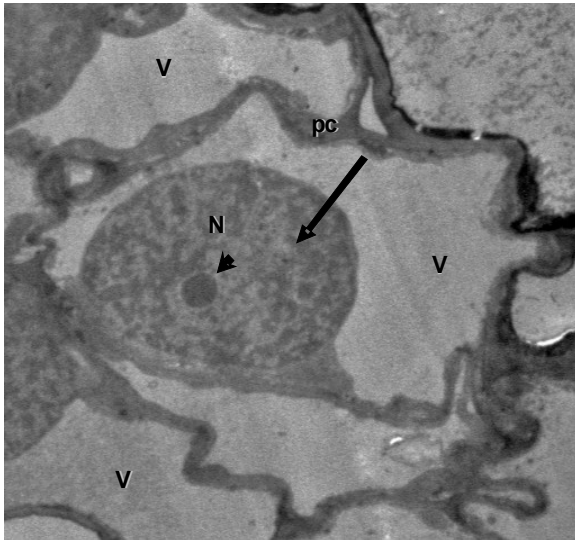
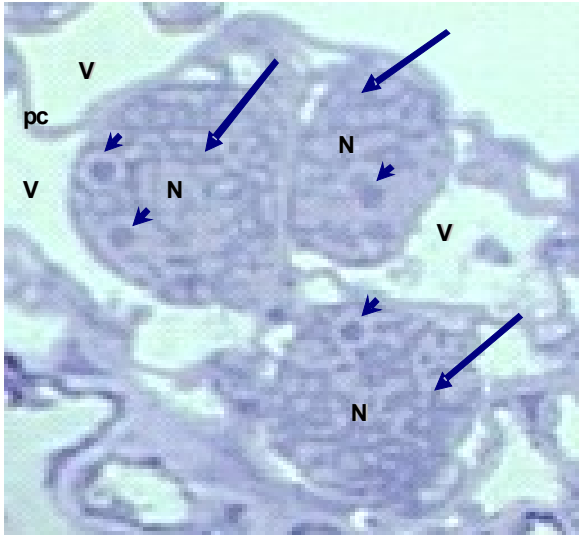


Fig. 10 Imágenes del núcleo interfásico de *S. spruceanum* obtenidas por medio de los tres tipos de Microscopía. A) Microscopía de luz, 100 X; B) Microscopía Electrónica de Transmisión, 3000 X; y C) Microscopía de Fuerza Atómica, en un barrido de 45 μm . Se puede observar la estructura general de la célula. Pared celular (pc), vacuola (V), núcleo (N), nucléolo (n) y cromatina (flecha).

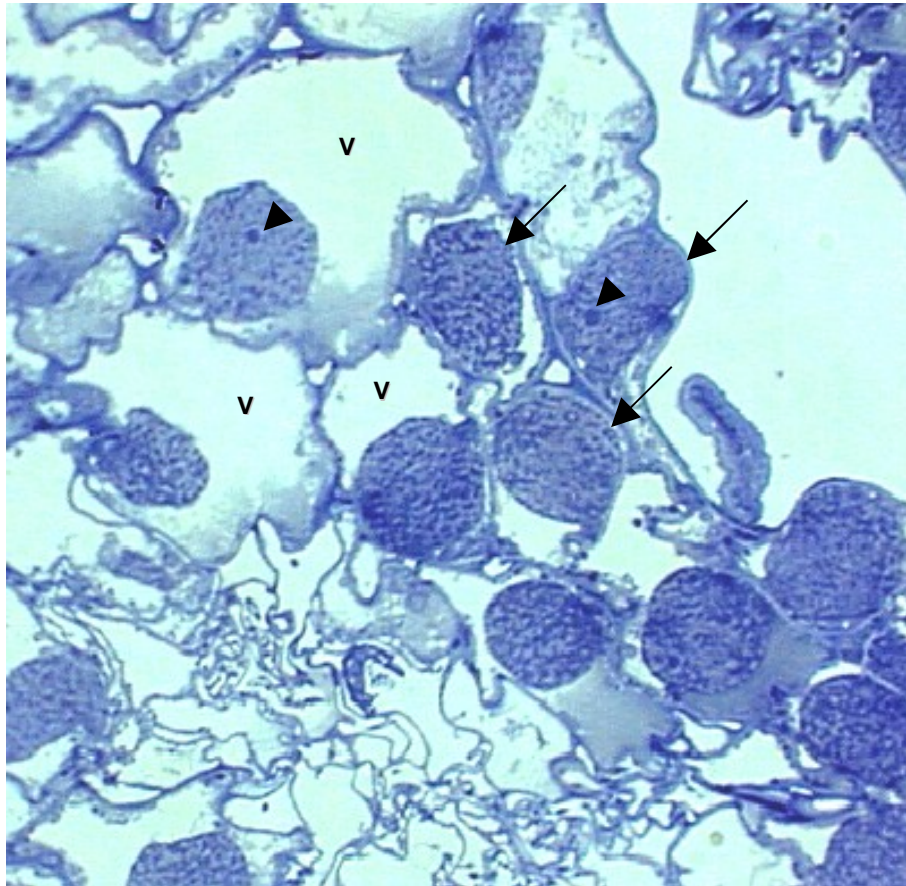


Fig. 11 Imagen panorámica de un corte semifino de ovario de *S. spruceanum* . Vacuolas (V), núcleo reticulado (flecha), nucleolo (cabeza de flecha). Objetivo de inmersión 100X

La figura 11 nos presenta una imagen general de *S. spruceanum*, en la cual podemos ver claramente a un aumento de 100X del Microscopio de luz, las grandes vacuolas que las células del tegumento poseen, además de la forma reticulada de la cromatina compacta del núcleo. Este tipo de imagen se obtiene solo usando el Microscopio de Luz; con esta referencia general del tejido, se puede ubicar una o más zonas que pudieran ser de interés para el estudio.

En la figura 12.a y 12.b se pueden observar organelos como vacuola, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, que a pesar de la pequeña cantidad de citoplasma que existe en la célula, en éste se acomodan todos los organelos necesarios para el eficiente funcionamiento de esta. Se destaca en gran tamaño que posee el núcleo interfásico, en el cual la cromatina posee una organización de tipo reticulada (12.a), con gran abundancia de estructuras granulares en el espacio intercromatiniano. El nucléolo es una estructura bien definida. En algunos casos, se pueden presentar más de uno por núcleo. También en las imágenes obtenidas, podemos ver las distintas zonas que el nucléolo posee.

En estas imágenes también puede verse una unión estrecha entre célula y célula (13.a), la pared celular y un poco de citoplasma de ambas células. Por la forma del corte, no es posible ver todas las estructuras celulares, por esta razón, solo vemos una mitocondria de una sola célula, aunque debe de poseer más que esta. Aquí, también se aprecia una pequeña parte del retículo endoplásmico rugoso (RER), cercano a la envoltura nuclear. Mientras que en la figura 13.b es posible ver acercamientos de la figura 13.a, donde se puede apreciar que el retículo endoplásmico rugoso, tiene a su alrededor, pegados una hilera de ribosomas, donde el RER está estrechamente relacionado con la envoltura nuclear.

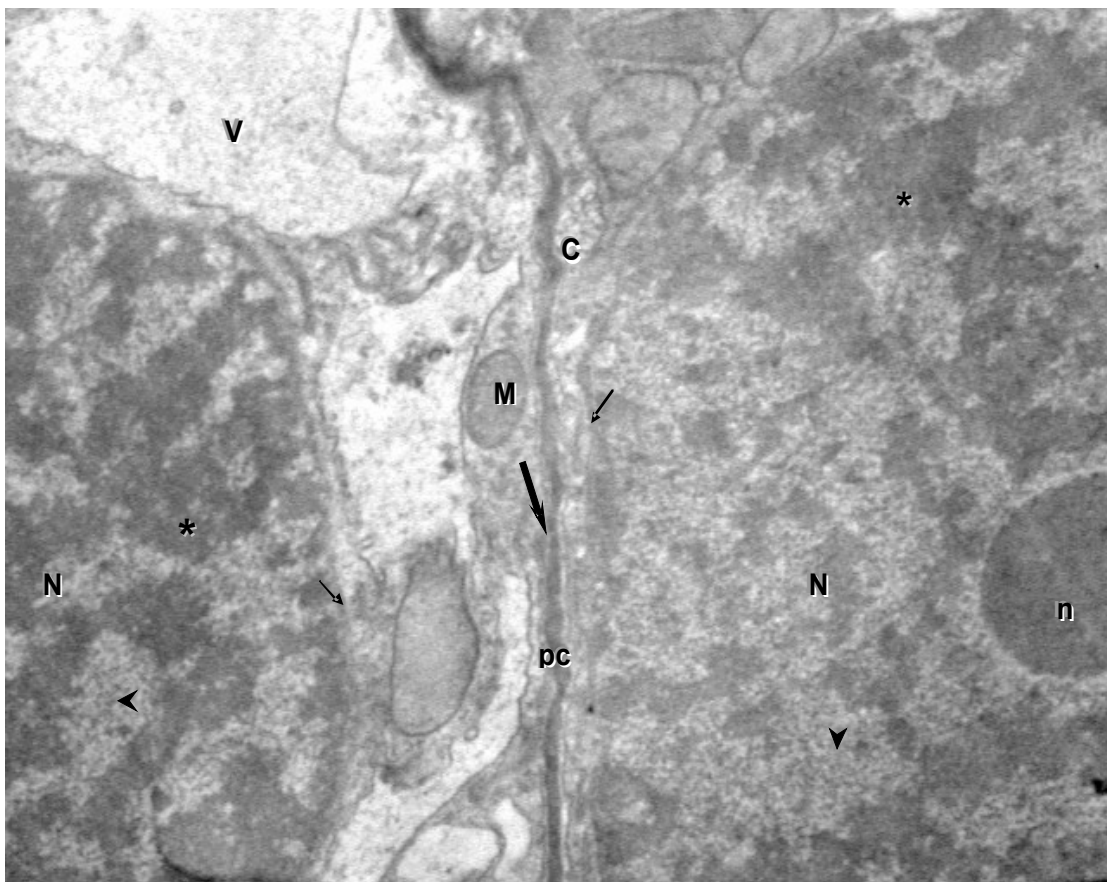


Fig. 12. a Imagen de los componentes celulares de *Soridium spruceanum* Miers. En esta figura se observa la unión estrecha entre ambas células (señalada por una flecha en negrita). Se logran distinguir componentes celulares tales como citoplasma (C), pared celular (pc), mitocondrias (M), vacuolas (V); otros componentes también observados aquí son la envoltura nuclear (señalada por flechas pequeñas), núcleo(N), nucleolo (n) Cromatina (*) y espacios intercromatinianos (cabeza de flecha). Aumento: 10 000X

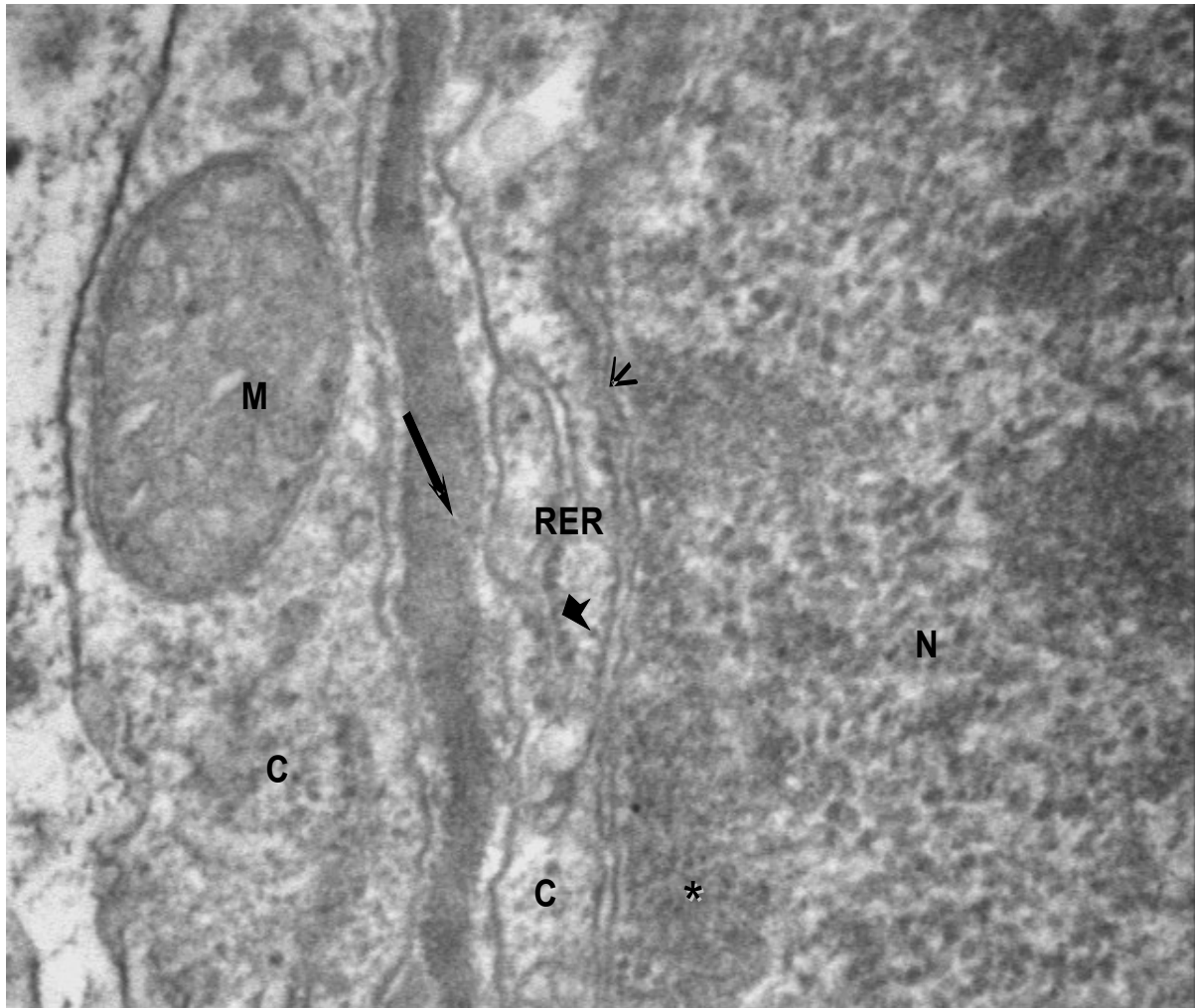


Fig. 12. b Se pueden observar la unión estrecha a un mayor aumento (flecha en negrita). Además, un poco de citoplasma (C) de ambas células, mitocondria (M). En la otra célula, se pueden observar el retículo endoplásmico rugoso (RER), con ribosomas pegados a este (cabeza de flecha pequeña). En el núcleo (N), se aprecian la membrana nuclear (flecha corta), la cromatina (*) y en el espacio intercromatiniano (cabeza de flecha), ya se alcanzan a distinguir estructuras granulares. Aumento: 40000 X.

El nucléolo también puede verse a mayores aumentos, donde se alcanzan apreciar dos zonas del nucléolo, el componente fibrilar denso y el componente granular. En esta zona, podemos apreciar estructuras granulares, que son presumiblemente ribosomas inmaduros (fig. 13.a). Aunque fuera del nucléolo también se pueden ver gránulos en el espacio intercromatiniano, probablemente gránulos de Lacandonia y esto puede inferirse por sus dimensiones, de alrededor de 30 nm. Estas estructuras pueden ser vistas a mayor aumento y detalle en la figura 13.b. Aquí, los gránulos de lacandonia se ubican en la zona intercromatiniana, de un tamaño de alrededor de 30 nm.

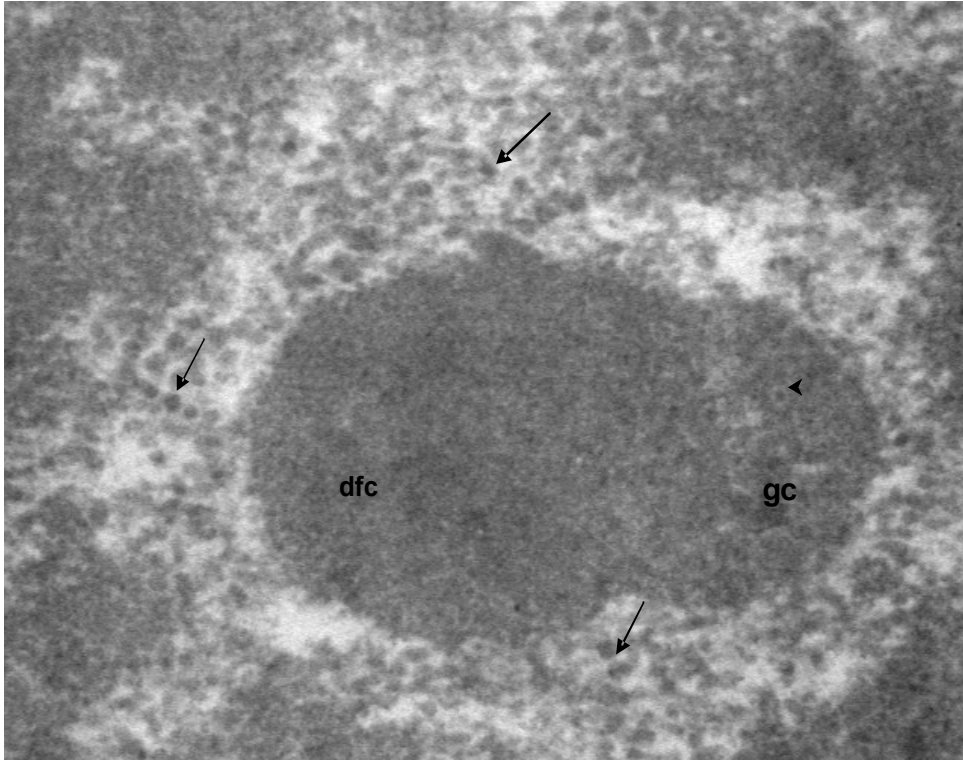


Fig. 13. a Nucléolo. Se distinguen al menos dos zonas de éste; el componente fibrilar denso (dfc) y el componente granular (gc), además de observarse estructuras granulares, dentro y fuera del nucléolo (cabeza de flecha). Aumento: 50000 X

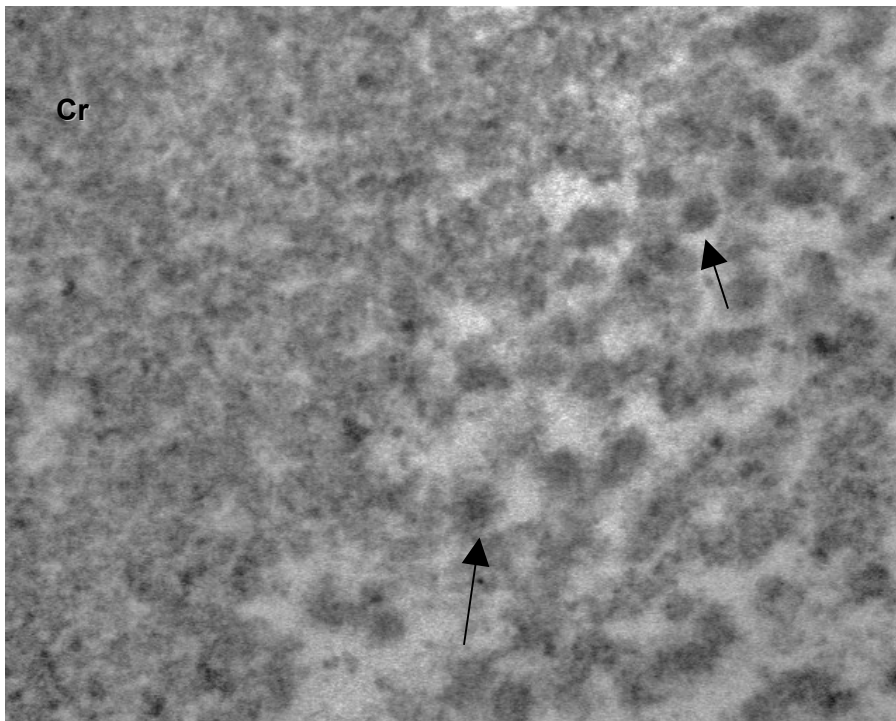


Fig. 13. b Gránulos de Lacandonia. Se observa una parte de la cromatina compacta a la izquierda (Cr). Del lado derecho señalados con flechas, se ven estructuras granulares de alrededor de 30 nm.

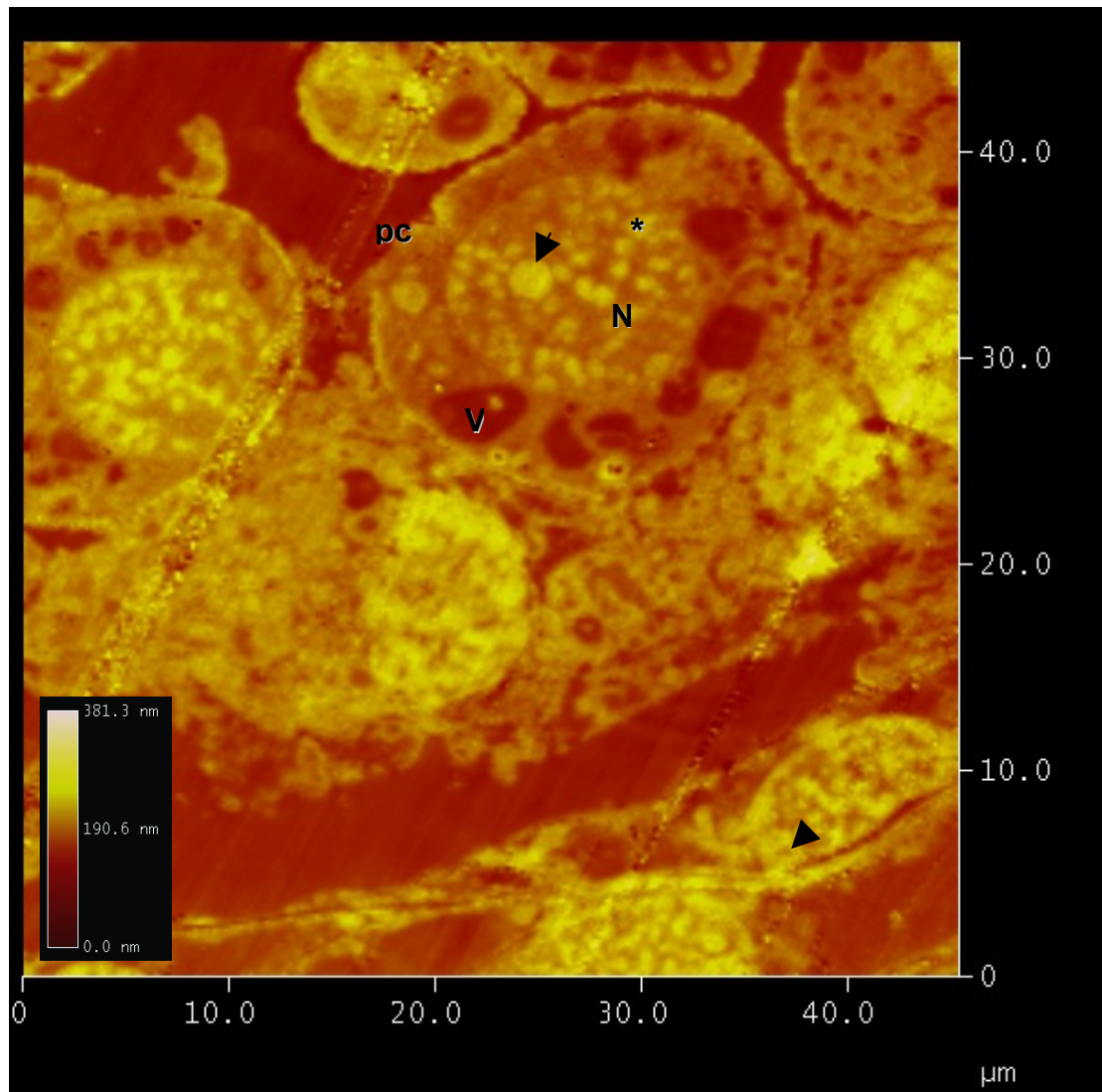


Fig. 14 Núcleo interfásico de *S. spruceanum* Miers. Botón floral. Células del tegumento que recubre a las células del ovario (cabeza de flecha). Núcleo celular de una célula que forma parte del ovario. Pared celular (pc), Vacuola (V), núcleo (N), nucléolo (flecha), cromatina (*).

En las imágenes obtenidas a partir de las observaciones realizadas con el AFM, se observa el Citoplasma, Vacuola, pared celular, Núcleo celular, cromatina y nucléolo. En la figura 14 se puede ver la imagen topográfica del tejido en estudio, además de ver una escala de color donde podemos ver que las zonas más brillantes son las más elevadas, con un grosor de 381.3 nm., mientras que las oscuras son los valles del tejido, las cuales tienen un grosor de 0 nm. Esta imagen, muestra dos partes importantes del botón floral de *S. spruceanum*; las células del tegumento (cabeza de flecha), que se distinguen por ser células con mayor espacio intracelular y con menor número de núcleos, además de que son las que recubren a una parte del ovario, donde hay mayor actividad celular, por lo tanto son huecas, con mucho núcleos y nucléolos.

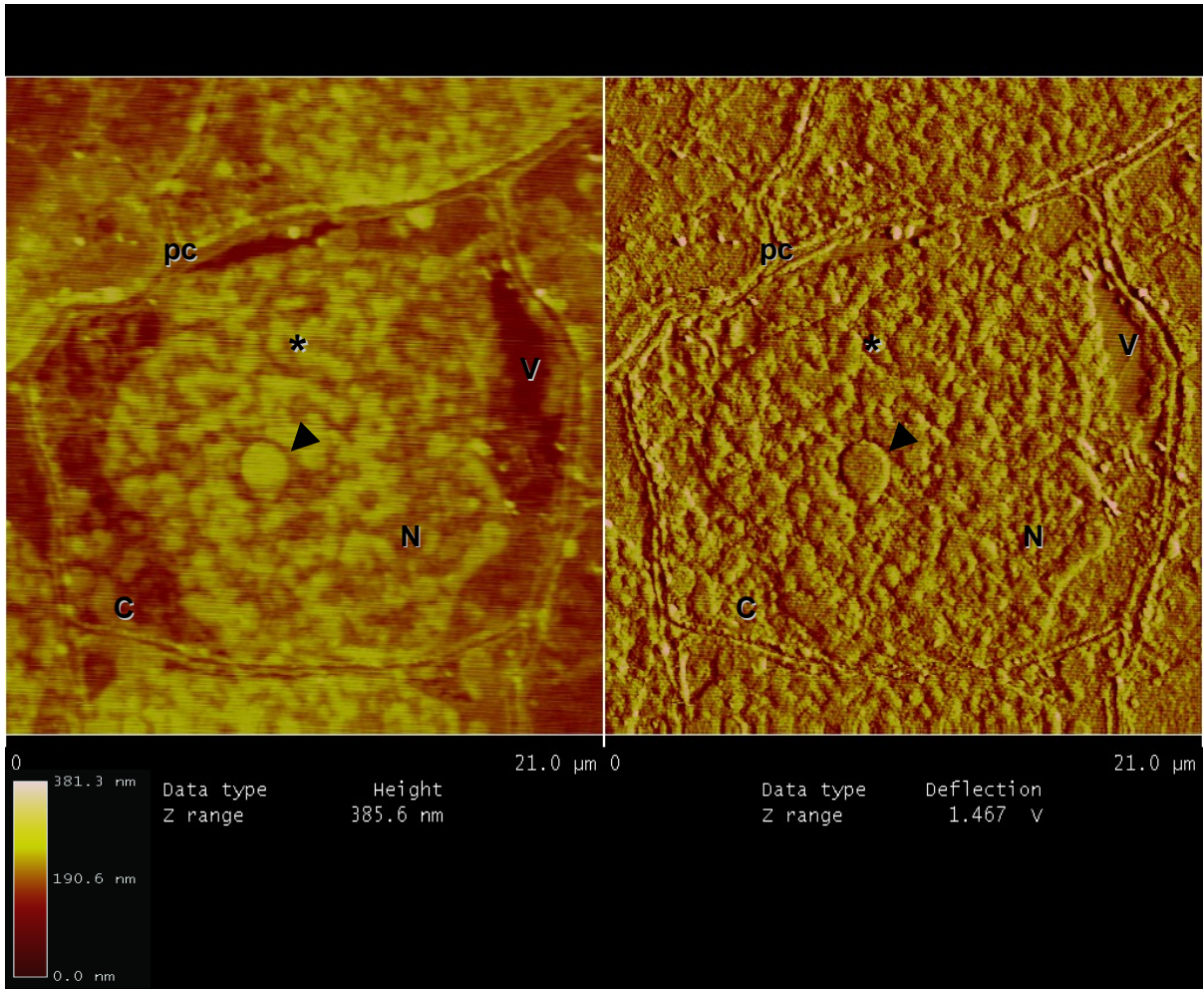


Fig. 15 Núcleo celular interfásico de *Soridium spruceanum* Miers. Pared celular (pc), Citoplasma (C), Vacuola (V), Núcleo (N), Cromatina (*), y Nucléolo (cabeza de flecha)

La figura 15 muestra dos tipos de imágenes que pueden ser obtenidas mediante el AFM, solo cambiando algunos parámetros dentro del software del microscopio. Las imágenes obtenidas son similares aunque dan información distinta; la imagen izquierda nos da una noción del grosor del tejido, mientras que la imagen derecha mide la deflexión de la punta cuando esta recorre el tejido. Además, en esta última se hace más evidente la forma de la pared celular y resalta la apariencia de núcleo reticulado. También se ven claramente estructuras observadas en los otros dos tipos de microscopios, como citoplasma, vacuolas, núcleo, nucléolo, cromatina.

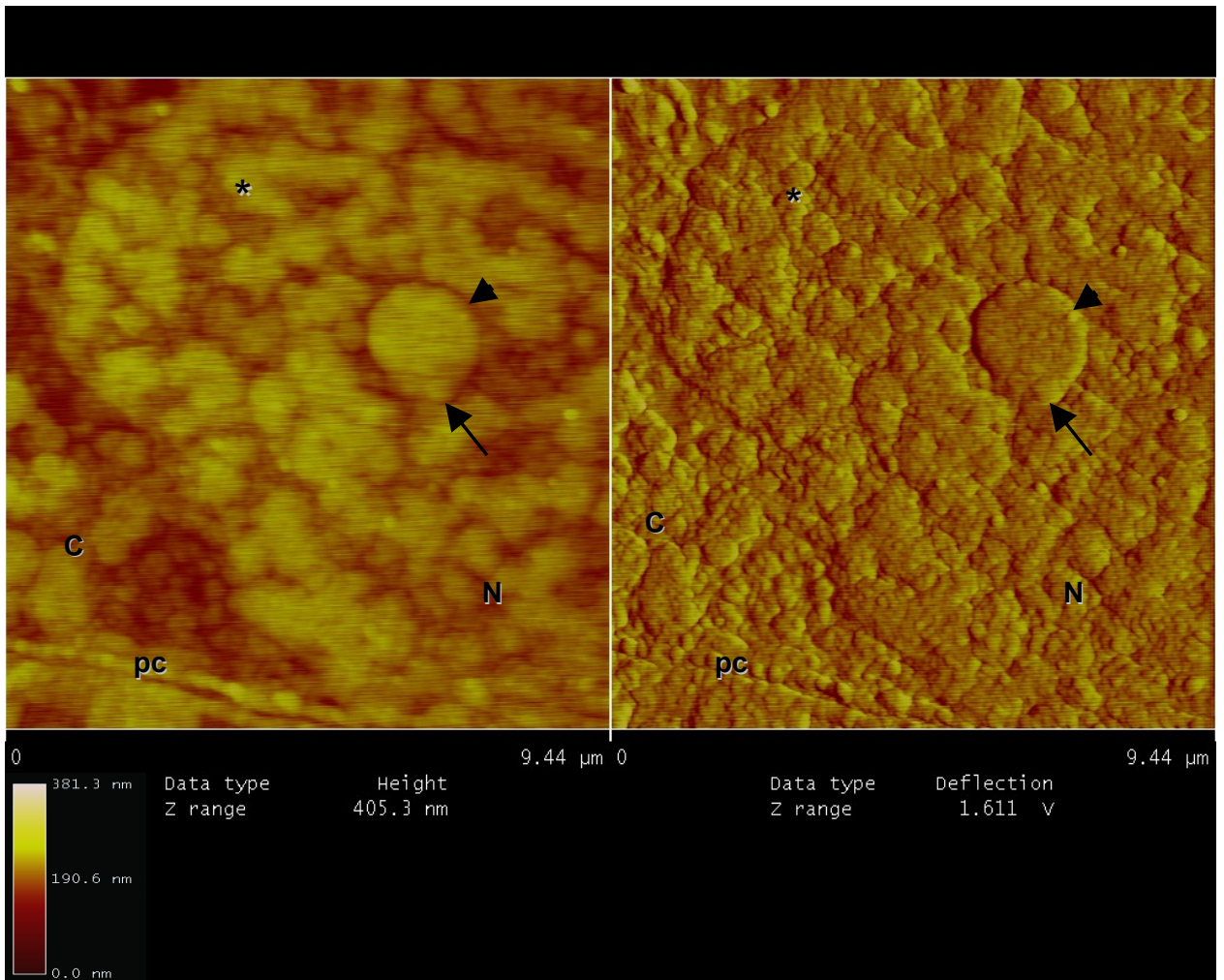


Fig. 16 Acercamiento del núcleo de *Soridium spruceanum* Miers. Pared celular (pc), Citoplasma (C), Vacuola (V), Núcleo (N), Cromatina (*), Nucléolo (cabeza de flecha). Región del organizador nucleolar (flecha)

En un acercamiento de la figura 15 se observa en 16, además de las estructuras antes mencionadas, la región del organizador nucleolar (NOR), que se señala con una flecha. Se ve como una pequeña protuberancia del nucléolo, este tipo de estructura se le ha relacionado con la formación del nucléolo después de la división celular, ya que se han localizado muchos de los componentes que están involucrados en su formación. Por este motivo, es una estructura que puede verse un poco antes de que la célula inicie su actividad celular.

DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron con el AFM fueron buenos, aunque no con la resolución deseada. A pesar de las grandes cualidades que el AFM tiene, aun es difícil obtener imágenes a aumentos mayores debido a diversos factores. Uno de ellos es que el lugar donde se trabaja en este instrumento debe estar bien ubicado y estar en instalaciones adecuadas para evitar las vibraciones que llegan a afectar la imagen que obtenemos en la pantalla de la computadora. Esto sin contar con que las muestras deben estar lo más libre de polvo y contacto con la grasa de las manos, que en muchas ocasiones es inevitable.

Si estas condiciones son superadas, aun tenemos que la resina donde se incluyen las muestras no es la más adecuada para el trabajo, aunque si proporciona la dureza necesaria para poder verla, esta desgasta la punta y cuando se requiere llegar a aumentos mayores, la fineza de la punta ya no es la ideal para hacerlo, y aunque se quiera cambiar para hacer mejores observaciones esto puede provocar que la zona en la que estemos trabajando, se pierda al hacer esta manipulación. Debido a estos factores, la imagen aun no ha sido la más adecuada para obtener información a niveles atómicos. Este problema de la resina se ha trabajado mucho en este laboratorio, por tal motivo, la metodología es algo distinta de la metodología que normalmente se sigue para procesar material para TEM.

Esto provoca otro problema al cortar nuestro bloque donde esta incluido el tejido de las plantas que es muy duro, por los componentes de la pared celular que poseen las plantas. Por esto se tiene que aprovechar los primeros cortes y evitar rasgar el tejido, así como el daño a la punta. Este problema es solucionado con manipulación cuidadosa del usuario del microtomo.

Muchos de estos factores, han sido controlados y en algunos casos eliminados casi por completo, por esta razón, las imágenes pueden mejorar. Sin embargo, en la dureza ideal y la versatilidad de ésta, para el manejo en soluciones y hacer experimentos *in situ*, aun se tiene mucho trabajo por delante, ya que lo principal es conservar en buenas condiciones el tejido y con una mayor facilidad para el trabajo en cualquier condición. A pesar de estos inconvenientes se ha podido reducir el daño tanto a la punta como al tejido.

Un método para reducir el desgaste del tejido es cambiar el modo de operación del instrumento, como podría ser el modo “*tapping*”. Otra opción es, además de cambiar a

este modo de operación, intentar trabajar en medio líquido, esto también implicaría un cambio de resina, que podría darnos otros resultados. Esto podría acercar las observaciones en el AFM a las observaciones realizadas en el TEM, incluso se mejorarían aún mas, si es que la punta que se usa en el modo tapping puede darnos una mayor resolución, debido a su grosor y movimiento.

CONCLUSIONES

Si bien hay todavía muchas cosas que hacer, este trabajo proporciona algunas conclusiones que son importantes como antecedentes a otros trabajos que deseen explorar tejidos mediante el uso del AFM.

→ **La estructura de las células del ovario de *S. spruceanum*. Observada con ML, TEM y AFM es similar a la estructura observada en otras especies del Orden Triuridales.**

Hemos podido identificar 5 estructuras celulares comunes en los tres microscopios, tales como la pared celular, citoplasma, vacuolas, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y núcleo celular. Todas las células tienen una forma similar más o menos poliédrica con el citoplasma ocupado en mayor proporción por las vacuolas.

→ **Los núcleos celulares de *S. spruceanum* presentan cromatina de tipo reticulado observable tanto por microscopía de luz, electrónica de transmisión y de fuerza atómica.**

En general todos los núcleos observados en las células del ovario de *S. spruceanum* presentan un nucleolo conspicuo y un arreglo de la cromatina de tipo reticulado. Esta característica fue posible observarla por los tres tipos de microscopía.

→ **Los gránulos de Lacandonia están presentes en lo núcleos de las células del ovario de *Soridium*.**

Los gránulos de Lacandonia son visibles en el TEM de manera clara y se encuentran de manera abundante. Por sus dimensiones no es posible observarlos con el ML pero con el AFM fue posible distinguir que en la región intercromatiniana se puede apreciar una estructura granular que sugiere la observación de estas estructuras con esta herramienta.

→ **La microscopía de fuerza atómica es una herramienta poderosa y potencialmente útil en el estudio de la estructura fina de las células vegetales y en particular del núcleo.**

Aún se tiene mucho que explorar en cuanto a la metodología para el procesamiento de muestras para el AFM, esto representa uno de los principales retos a vencer en futuros proyectos, así como también se tiene que pensar en expandir las observaciones a

tejidos animales y realizar ensayos donde las observaciones se realicen en condiciones de fluido fisiológico, algo que no se puede hacer en el TEM.

Por esta razón el AFM presenta una gran potencialidad para el análisis de la estructura fina pues no existen las restricciones que impone la TEM como es el trabajar en condiciones de vacío.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agredano-Moreno LT., 1991, **Estudio ultraestructural comparativo del núcleo celular interfásico de Lacandonia schismatica E. Martínez and C.H. Ramos (Triuridales: Lacandoniaceae) y Triuris alata Brade (Triuridales: Triuridaceae).** Tesis profesional de 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 E. Martinez & 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 LP, 2000, **New evidence that Lacandonia granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules,** *Biology of the Cell* 92: 71-78, 2000
- Agredano-Moreno L.T., 2001. **Los gránulos de Lacandonia. Caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y aislamiento de una fracción enriquecida en gránulos.** Tesis de posgrado. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG II), 2003, **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and the families of flowering plants: APG II,** *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.
- Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E., 1982, **Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy,** *Physical Review Letters* 49: 57-61 Jul.
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C., 1986 **Atomic Force Microscope,** *Physical Review Letters* 56: 930-933 Oct.
- Birdi K.S., 2003, **Scanning Probe Microscopes. Applications in Science and Technology,** CRC Press, Press, USA.

- Braga, P.C. y Ricci, D. **Imaging Methods in Atomic Force** Microscopy, 2004. En: Braga, P.C. y Ricci, D. Eds. Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology 242: 13-22. Humana Press. New Jersey, USA.
- Bustamante C.D., Keller R., 1995. **Scanning Force Microscopy in Biology**, Physics Today, 32-38 Dec.
- Burleigh J.G., Mathews S., 2004, **Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: Implications for resolving the seed plant tree of life**, American Journal of Botany, 91: 1599-1613.
- Chase M.W., Fay M.F., Savolainen V., 2000, **Higher-level classification in the angiosperms: new insights from the perspective of DNA sequences data**. **Taxon**, 49:685-704.
- Chase M.W., 2004, **Monocot relationships: an overview**, Am. J. Botany, Oct. 91: 1645 - 1655.
- Cooper, G. M., 2004, **The cell: A Molecular Approach**, 3rd edition, ASM press, Washington, USA.
- Cronquist A., 1988, **An Integrated system of classification of flowering plants**, Columbia University Press, New York, USA.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF, 1985. **The families of Monocotyledons**. Spring Verlag, Berlin; Heidelberg.
- Davidse G., Martínez S.E., 1990, **The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae)**, Syst. Bot. 15: 635-637.
- Davidse G., Sousa MS, Chater AO, 1994, ***Alismataceae and Cyperaceae Vol. 6***, IBUNAM, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum (London).

- Espinosa S., 1991, ***Estudio estructural e histoquímico de individuos femeninos de Triuris alata (Triuridaceae): Nuevo registro para México.*** Tesis profesional de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Fragoso R.J., 2000, ***Estudio de la estructura celular de Lacandonia schismatica por microscopia de fuerza atómica.*** Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Gandolfo MA, Nixon KC, Crepet WL, 2002, ***Triuridaceae fossil flowers from the Upper Cretaceous of New Jersey***, Am. J. Botany, Dec. 89: 1940.
- Gardner G., 1845, ***Description of Peltophyllum: a new genus of plants allied to Triuris of Miers, with remarks on their affinities***, Transactions of the Linnean Society of London 19: 155-160.
- Green P.S., Soldbrig O.T., 1966, ***Sciaphila dolichostyla* (Triuridaceae)**, Journal of the Arnold Arboretum, 47: 266-269.
- Jiménez-García L.F., Agredano-Moreno L.T., Segura Valdéz M.L., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H., and Vázquez-Nin G.H., 1992, ***The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of Lacandonia schismatica (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non typical extranucleolar particule.*** Biol. Cell 75:101-110
- Jiménez-García L.P., Reynoso R., Fragoso R., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M.L., González S., Ramos C.H., Martínez E., 1998, ***Biología celular de Lacandonia schismatica. Análisis por Microscopía Electrónica y de Fuerza Atómica***, Bol. Soc. Bot., México 62: 5-14.
- Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L. 2004. ***Visualizing Nuclear Structure in situ by Atomic Force Microscopy.*** En: Braga, P.C. y Ricci, D. Eds. Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology 242:191-199. Humana Press. New Jersey, USA.

- Jiménez-Ramírez J., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M.L., Jiménez-García L.P., 2002, **Lacandonia granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei**, *Biology of the Cell* 94: 511-518.
- Karp, G., **Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments**, 4th edition, John Wiley & Sons, Inc., California, USA, 2005
- Kasas, S., **Sample Preparation Method for Observing RNA Polymerase Activity by Atomic Force Microscopy**, 2004. En: Braga, P.C. y Ricci, D. Eds. *Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology* 242:341-347. Humana Press. New Jersey, USA.
- Maas, P.J. M. and Rübtsamen, T., 1986, Triuridaceae. *Flora Neotrópica* 40:1-55
- Mas-van de Kamer H., 1995. Triuridiflorae-Gardne's delight? In Rundall P.J., Cribb P.J., Cutler D.F., Humphries C.J. [eds.]. **Monocotyledons: systematics and evolution**, 287-301. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Martínez S.E., Gomez P.L.D., 1994. **Triuridaceae**. In Davidse G., Sousa M., Chatters A.O., [eds.] **Flora Mesoamericana** Vol. 6 Alismataceae a Cyperaceae 19. UNAM, México.
- Martínez E., Ramos C.H., 1989, **Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México**, *Ann. Bot. Gard.* 76: 128-175
- Miers J., 1852, **On the Family Triuridaceae**, *Proceeding of the Linnean Society of London*, 21: 43-59
- Moziño, J. M., 1958, **Flora of Guatemala**, Botany, Vol, 24, Fieldiana, Part I.
- Qiu Y.L., Lee J., Bernasconi-Quadroni F., Soltis D.E., Soltis P.S., Zanis M., Zimmer E.A., Chen Z., Savolainen V., Chase M.W., 1999, **The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes**, *Nature*. 1999 Nov 25;402(6760):404-7. Erratum in: *Nature* 2000 May 4;405(6782):101.

- Reynoso R., 1996, **Ultraestructura del citoplasma de *Lacandonia schismatica***. Tesis profesional de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Soltis P.S., Soltis D.E., 2004, **The origin and diversification of angiosperms**, Am. J. Botany, Oct. 91: 1614 - 1626.
- Soltis P.S., Soltis D.E., Chase M.W., 1999, **Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology**. Nature. Nov 25;402(6760):402-4.
- Ray J., 1703, **Methodus plantarum emendata et aucta**, Smith and Walford, London, UK.
- Rübnsamen-Weustenfeld T., 1991, **Morphologische, embryologische und systematische Untersuchungen un Truroidaceae**. Bibliotheca Botanica 140:1-61.
- Takhtajan A.L., 1997, **Diversity and Classification of flowering plants**, New York, Columbia University Press.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O., 2000, **Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas**, Facultad de Ciencias, UNAM; Fondo de Cultura Económica, México.
- Vázquez Nin, G.H., Echeverría Martínez, O. M., Jiménez García, L. F. (2003). "El núcleo celular interfásico. Morfología y función" en: "**Biología Celular y Molecular**" L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.). Prentice Hall. México.
- Vazquez-Santana S., 1992. **Estudio estructural e histoquímico de *Lacandonia schismatica* Martínez-Ramos (Lacandoniaceae): familia, género y especie nueva para la ciencia**. Tesis profesional de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México.