BIOLOGÍA CELULAR DE *LACANDONIA SCHISMATICA*. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y DE FUERZA ATÓMICA

LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA¹, RAFAEL REYNOSO ROBLES^{1, 2}, ROGELIO FRAGOSO SORIANO³,
LOURDES TERESA AGREDANO MORENO¹, MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ², SERGIO
GONZÁLEZ MORENO⁴, CLARA HILDA RAMOS⁵, ESTEBAN MARTÍNEZ⁵

¹Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel. 622 4881, fax 622 4828; email: lfjg@hp.ciencias.unam.mx ²Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Tlalpan 4502, 14080, México D.F. ³Departamento de Física, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. ⁴ENEP Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. ⁵Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior C.U. 04510, México D.F.

Resumen. Hemos descrito previamente el núcleo celular de *Lacandonia schismatica* con microscopía electrónica de transmisión (MET). En este trabajo se describe la ultraestructura del citoplasma de esta especie y se determina su actividad fotosintética. Asimismo, se presentan resultados sobre su estructura celular utilizando microscopía de fuerza atómica. Se prepararon fragmentos de botones florales de *L. schismatica* para MET, utilizando una doble fijación con glutaraldehído y paraformaldehído. En el citoplasma de las células de los tegumentos y del receptáculo floral, se observan de 1 a 3 aparatos de Golgi por célula, aunque rara vez se presentan 4 o 5. El número de cisternas es de 3 a 7 y tienen un espesor de unas 0.81 μm . Las vesículas asociadas miden unos 0.04 μm de diámetro. Las mitocondrias tienen una longitud promedio de 0.9 μm y un espesor de 0.35 μm . También se observan estructuras similares a los plastos, con inclusiones densas a los electrones pero sin estructuras membranosas internas o tilacoides diferenciados. Estas estructuras presentan doble membrana y en ocasiones tienen forma de reloj de arena o audífonos. Las mediciones indican que *L. schismatica* no presenta fotosistema II, por lo que los plastos descritos no realizan fotosíntesis. Los ribosomas unidos a retículo endoplásmico miden unos 15 nm de diámetro. Las células presentan una o varias vacuolas y un núcleo grande. El citoplasma está representado solamente por una pequeña franja en donde se observan las estructuras descritas.

Palabras clave: *Lacandonia schismatica*, microscopio de fuerza atómica.

Abstract. We have previously described the cell nucleus of *Lacandonia schismatica* by transmission electron microscopy. In this paper, the ultrastructure of the cytoplasm of *L. schismatica* and photosynthesis activity were studied. In addition, atomic force microscopy was used to generate images of cell structure. Samples were prepared for standard electron microscopy using glutaraldehyde-paraformaldehyde fixation. Cells from tegument or receptacle show 1-3 Golgi apparatus. They have 3-7 cisternae, 0.81 μm width. 0.04 μm in diameter vesicles were also observed associated to cisternae. Mitochondria were 0.9 μm long and 0.35 μm width. Double membrane earphones-like plastids were observed with lipid inclusions but no developed tilacoids. No photosynthesis activity was detected in these cellular structures. Rough endoplasmic reticulum is similar to that of other eukaryotes and associated ribosomes are around 15 nm in diameter. A large nucleus and one or several vacuoles are present in cells of *L. schismatica*, therefore, leaving a very restricted portion for cytoplasm and organelles.

Key words: *Lacandonia schismatica*, atomic force microscopy.

Lacandonia schismatica E. Martínez/C.H. Ramos (Lacandoniaceae : Triuridales) es una planta endémica y rara (Diario Oficial, 1994), encontrada hasta ahora en sólo dos localidades de la Selva Lacandona

de México (Martínez y Ramos, 1989 ; Martínez *et al.*, 1994 ; Reyes-García y Sousa 1995). Su característica más notable es la inversión espacial de sus órganos reproductores, con los ovarios rodeando a los estam-

bres (Cronquist, 1988; Martínez y Ramos, 1989; Márquez-Guzmán *et al.*, 1989; Martínez, 1994). Esta distribución, única entre las angiospermas, ha generado estudios para conocer mejor su biología. Tiene 9 cromosomas en el complemento haploide (Davidse y Martínez, 1990). También se ha descrito la germinación de los granos de polen dentro de la antera y una reproducción cleistogámica (Márquez Guzmán *et al.*, 1993), que podría explicar la falta de variación genética en su localidad principal (Coello *et al.*, 1993). El saco embrionario de *L. schismatica* es diferente al de otras angiospermas (Vázquez-Santana *et al.*, 1998). Esta planta monocotiledónea es saprófita y presenta una micorriza vesículo-arbuscular (Palacios-Mayorga y Pérez-Silva, 1993). Se ha descrito poco de la biología celular de *L. schismatica*. Se conoce la estructura nuclear, que es de tipo reticulado y presenta gránulos de 30 nm de diámetro de naturaleza ribonucleoproteica, no observados previamente entre los eucariontes (Jiménez García *et al.*, 1992 ; Agredano Moreno *et al.*, 1994).

Este trabajo ofrece nuevos elementos en el conocimiento de la biología celular de *L. schismatica*. Se

describe la ultraestructura de varios organelos y sistemas endomembranosos y, por el carácter saprófita de la especie, se da énfasis a los plastos, de los que además se confirma la suposición de ausencia de actividad fotosintética. El trabajo también ilustra las primeras observaciones de estructura celular de plantas vista por medio de microscopía de fuerza atómica, que abre una posibilidad de analizar las estructuras celulares con mayor resolución vertical y horizontal.

Material y métodos

Microscopía electrónica

Se fijaron fragmentos de aproximadamente 1 mm³ de botones florales de *L. schismatica* en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% amortiguada en solución de fosfatos salino (PBS), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se enjuagaron en PBS por tres veces durante 10 minutos cada vez. La postfijación se realizó con tetraóxido de osmio al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo con una serie de

Figura 1. Micrografía electrónica de una célula de los tegumentos de *L. schismatica*. A bajos aumentos, se observa la presencia de un núcleo reticulado grande (N) que generalmente presenta dos nucléolos (Nu) y cuerpos anulares (flecha). En el citoplasma predomina una o dos vacuolas grandes (V) que abarcan la mayoría del espacio celular. En el escaso citoplasma restante se observan mitocondrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER), plastos (P) y aparatos de Golgi pequeños (AG).

Figura 2. Micrografías electrónicas de aparatos de Golgi de *L. schismatica*. a] El aparato de Golgi, asociado con un gran número de vesículas (v) se observa entre la pared celular (Pc) y la vacuola (V). b] En el aparato de Golgi se distinguen los componentes cis (C), medio (M) y trans (T), asociados a vesículas (v). c] El aparato de Golgi se observa asociado con vesículas (v), entre un plasto (P) y una vacuola (V). Entre el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi se nota la región intermedia (RI).

concentraciones graduales de etanol. 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. Los cortes ultrafinos de unos 50 nm de espesor se colocaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar y se contrastaron con acetato de uranilo al 3% durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.3% durante 10 minutos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión operando a 80 kV.

Microscopía de fuerza atómica

Se obtuvieron cortes semifinos de unas 0.2 μm de espesor, a partir del material preparado para microscopía electrónica. Las muestras se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se analizaron sin tinción en un Microscopio de Fuerza Atómica Autoprobe (Park Scientific) trabajando en modo de contacto. Las muestras fueron analizadas con el microscopio ope-

rando a una velocidad 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 silicio de 100 Å de radio de curvatura, montada en un cantilever de 0.6 μm . El microscopio trabajó con un scanner de 100 μm , con un área máxima de barrido de 100 μm . Las imágenes se generaron con la ayuda del software Proscan (version 3.1, Park Scientific, 1997).

Espectro de absorción

Se preparó un extracto de *L. schismatica* (2 mg homogeneizados en 1 ml de acetona al 80 %). En un espectrofotómetro Shimadzu UV-210 A se obtuvo el espectro de absorción, utilizando las condiciones de slit de 0.5 nm, λ (360-750 nm), 20 nm/cm. Como blanco se utilizó acetona al 80%.

Espectro de excitación y emisión de fluorescencia

Se obtuvo un espectro de excitación y emisión de fluorescencia del extracto acetónico (2 mg/ml de ace-

Figura 3. Micrografías electrónicas de mitocondrias de *L. schismatica*. a) En el interior de las mitocondrias se observan mitorribosomas (flechas pequeñas) y filamentos de ADN mitocondrial (flecha grande). En b) y c) se observan mitocondrias alargadas y redondas, respectivamente.

tona al 80%) de *L. schismatica* en un espectrofotómetro Perkin Elmer LS50B. Las condiciones usadas incluyeron un slit_{ex} -10 nm y un slit_{em} -10 nm. El espectro de excitación usado fue de 600-750 nm. λ_{em} 670 nm.

Medición de eficiencia fotoquímica del fotosistema II

Un fragmento de la planta, incluyendo tallo y flor de *L. schismatica*, se colocó en la pinza del equipo Plant efficiency analyser Hansa Tech (King's Lynn Norfolk England), se mantuvo en la oscuridad por 15 min y se acopló al sistema de iluminación y detección de fluorescencia de clorofila del fotosistema II.

Para determinar los parámetros de fluorescencia Fo fluorescencia basal, Fm (fluorescencia máxima), Fv (Fm-Fo) Fv/Fm (eficiencia fotoquímica del fotosistema II) se utilizaron las condiciones de λ excitación 660 nm, tiempo 5 seg, intensidad 900 $\mu\text{mol m}^{-2}$. La intensidad de la muestra fue de 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$

Resultados

La figura 1 ilustra una célula de los tegumentos del óvulo de *L. schismatica* observada por microscopía electrónica de transmisión. Las paredes celulares tienen un espesor de 0.3 a 0.4 μm . En el interior de la célula destacan 1] un núcleo voluminoso de tipo reticulado, en general con dos nucléolos y 2] una gran vacuola que abarca la mayoría del volumen celular. En el citoplasma, representado por una capa delgada de material que corre muy cerca de la pared celular y rodea al núcleo, se observan algunos elementos como las mitocondrias y los plastos. El aparato de Golgi es apenas visible a estos aumentos y el retículo endoplásmico rugoso se aprecia en algunas porciones.

La figura 2 (a-c) muestra el aparato de Golgi de *L. schismatica* observado por microscopía electrónica de transmisión, a grandes aumentos. Pueden observarse de 1 a 3 aparatos de Golgi por corte, aunque

Figura 4. Micrografía electrónica del retículo endoplásmico rugoso de *L. schismatica*. En el escaso citoplasma de esta especie, se observa retículo endoplásmico abundante asociado con ribosomas (flechas).

Figura 5. Micrografías electrónicas de plastos de *L. schismatica*. Los plastos contienen vesículas osmiofílicas abundantes (flechas) y tienen formas variadas. *a*] Plasto claviforme. *b*] Plasto en forma alargada, en donde se observa la doble membrana (flechas pequeñas). *c*] Plastos en forma de audífonos, con muy escasas membranas internas (flechas) cercanos a mitocondrias (M).

en ocasiones se pueden presentar 4 o hasta 5. Cada uno presenta de 3 a 7 cisternas, que miden $0.14\ \mu\text{m}$ de espesor y $0.18\ \mu\text{m}$ de longitud aproximadamente. Las porciones *cis*, *media* y *trans* se distinguen por su disposición respecto de las vesículas asociadas -de aproximadamente $0.04\ \mu\text{m}$ de diámetro- y el retículo endoplásmico rugoso orientado en general hacia su porción *cis*.

La figura 3 (a-c) muestra micrografías electrónicas de mitocondrias que se observan alargadas o redondas, dependiendo del plano de corte. En algunas se observan el ADN mitocondrial y los ribosomas intramitocondriales o mitoribosomas (figura 3 a). Las crestas y la doble membrana externa también son visibles.

La figura 4 muestra una parte del citoplasma de *L. schismatica* en donde se observa el retículo endoplásmico rugoso, por medio de microscopía electrónica de transmisión. Los ribosomas asociados a membrana o libres, tienen un diámetro de 13 a 15 nm.

En la figura 5 (a-c) se observa una micrografía electrónica de transmisión en donde se aprecian estructu-

ras semejantes a plastos, con inclusiones osmiofílicas, densas a los electrones. Hay una doble membrana externa pero no se presentan tilacoides o estructuras membranosas internas, salvo en raras ocasiones. Cuando así sucede, adquieren apariencia de reloj de arena o audífonos, con una longitud aproximada de 2 a $3\ \mu\text{m}$ (figura 5c). Por la naturaleza saprófita de la especie y por la ausencia de cloroplastos bien definidos, se supuso ausencia de actividad fotosintética, lo que se procedió a confirmar midiendo la actividad fotosintética, lo que se confirmó por los análisis de los espectros de absorción y fluorescencia.

Para determinar la presencia de pigmentos fotosintéticos se utilizó un extracto de flor y tallo —la planta no tiene hojas— de *L. schismatica* en acetona al 80% y se midieron los espectros de absorción de luz visible y de excitación y emisión de fluorescencia. Como se observa en la figura 6, existe una pequeña absorbancia a 660-670 nm, considerada despreciable en comparación con la de partes fotosintéticas de *Phaseolus aureus*. El espectro de excitación de fluorescencia también mostró una pequeña excitación a 660 nm y una emisión a 670 nm. No se obtuvo registro de ac-

Figura 6. Espectro de absorción de luz visible de un extracto de flor y tallo de *L. schismatica*. Condiciones: slit 0.5 nm. 20 nm/cm, λ 380-750 nm. Blanco: acetona al 80 %. — *Lacandonia schismatica*. - - *Phaseolus aureus*. *P. aureus* registra absorbancia a 660 nm. *L. schismatica* no registra absorbancia a 660 nm.

Figura 7. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de células de ovario de *L. schismatica*. En 7a] se observa una imagen de un corte longitudinal de ovario en donde se aprecian el saco embrionario (SE) y células de los tegumentos (T). La flecha señala una célula de tegumento en mitosis. La escala de colores a la derecha indica las alturas sobre la superficie del corte. En 7b] se muestra a mayor aumento el núcleo (N), el nucléolo (n), la cromatina (c), una vacuola (V) y la pared celular (pc), de la célula señalada por una cabeza de flecha en 7a. En 7c] se muestra la misma célula de 7b, desplegada en tercera dimensión, para apreciar la resolución vertical en el rango de 0 a 0.4 μm .

tividad fitoquímica del fotosistema II, lo que se puede deber a la ausencia de la misma o a que la cantidad de pigmento fotoquímico y su actividad están por debajo del límite de detección del equipo utilizado.

Con el objeto de conocer la estructura celular de *L. schismatica* con mayor resolución, iniciamos estudios de microscopía de fuerza atómica sobre cortes semifinos no teñidos de 0.1 a 0.2 μm de espesor, de material procesado para microscopía electrónica. Las muestras fueron analizadas con microscopía de fuerza atómica operando en modo de contacto. La figura 7 muestra imágenes de células de *L. schismatica* en donde se observan algunos elementos tisulares y celulares bien definidos. En la figura 7a se observa un corte de ovario en donde se notan el saco embrionario y las células de los tegumentos. La célula señalada con la cabeza de flecha ha sido ampliada en la figura 7b. Aquí es posible ver un núcleo con nucléolo y cromatina compacta. La pared celular es un elemento que sobresale del corte como protuberancias muy conspicuas. La resolución vertical puede ser notada por la escala de color que se muestra en un lado. En la figura 7c, la célula observada en la figura 7b ha sido procesada con el programa de reconstrucción del instrumento y se presenta desplegada en tres dimensiones. Se aprecia la mayor resolución vertical que permite este instrumento. La superficie del corte presenta una textura que refleja la estructura celular presente en ese corte en particular sin necesidad de tinciones especiales y con una resolución en el eje Z del orden de fracciones de micrómetro.

Discusión

La estructura nuclear ha sido estudiada previamente (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994). En el núcleo la cromatina es de tipo reticulado y está asociada con gránulos ribonucleoproteicos abundantes, de 32 nm de diámetro. También destacan estructuras tipo complejo sinaptonémico, centrómeros, cuerpos espiralados y estructura anulares, cuya composición, observada por métodos citoquímicos ultraestructurales, revela la presencia de factores de splicing, es decir, moléculas relacionadas con la eliminación de los intrones en los RNAs premensajeros (pre-mRNAs) (Agredano-Moreno *et al.*, 1994).

El aparato de Golgi es pequeño y las mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico son similares a los de otras especies. También se observan estructuras semejantes a plastos que, por no tener tilacoides desarrollados, no presentan actividad fotosintética. Estos datos coinciden con el carácter saprófito de la especie y la presencia de micorrizas en la raíz (Palacios-Mayorga y Pérez-Silva, 1993). La morfología de

estos plastos es similar a los ameboideos descritos durante el desarrollo normal de los cloroplastos (en Raven *et al.*, 1991), por lo que resulta interesante determinar si en *L. schismatica* ocurre un desarrollo incompleto o es una característica determinada genéticamente.

La presencia de aparato de Golgi, mitocondria y retículo endoplásmico rugoso similar al de otras especies de plantas, indica que la secreción celular incluyendo la formación de pared celular, la respiración aerobia y la síntesis de proteínas de secreción, son funciones normales en *L. schismatica*, aunque se llevan a cabo en regiones celulares muy pequeñas.

La posibilidad de observar estructuras celulares por medio de microscopía de fuerza atómica ha sido explorada en este trabajo, aplicándola a cortes semifinos sin teñir, de *L. schismatica*. Este tipo de microscopio ofrece la ventaja de obtener resolución molecular o atómica de la materia. 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). Los resultados muestran que es posible estudiar la estructura interna de células y tejidos. En particular hemos demostrado la factibilidad de utilizar este instrumento en el análisis de la estructura de células de material procesado para microscopía electrónica de transmisión, lo que facilita el análisis celular con mayor resolución vertical, sin requerir de técnicas de preparación especializadas. Mientras que en microscopía electrónica convencional la resolución horizontal ha permitido observar detalles de dimensiones nanométricas, con el microscopio de fuerza atómica se abre una posibilidad de obtener resoluciones similares —o incluso mayores— en tres dimensiones.

Agradecimientos

Deseamos agradecer al Dr. C. Falcony y al Dr. Carlos Vázquez L. del CINVESTAV, el apoyo para la realización del trabajo de microscopía de fuerza atómica.

Literatura citada

- Agredano-Moreno L.T., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H. y Vázquez-Nin G.H. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. *Biology of the Cell* 82:177-184.
- Coello G., Escalante A. y Soberón J. 1993. Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) in its only known locality. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80:898-901.

- Cronquist A 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden. New York.
- Davidse G. y Martínez E. 1990. The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Systematic Botany* 15:635-637.
- Diario Oficial de la Federación (órgano del gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo CD LXXXVIII Núm. 10. 1994.
- 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. *Journal of Structural Biology* 119:99-108.
- Jiménez-García L.F., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M.L., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H. y Vázquez-Nin G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae-Triuridales) reveals a non-typical extranuclear particle. *Biology of the Cell* 75:101-110.
- Márquez-Guzmán J., Engleman M., Martínez-Mena A., Martínez E. y Ramos, C.H. 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:124-127.
- Márquez-Guzmán J., Vázquez-Santana S., Engleman M., Martínez-Mena A. y Martínez E. 1993. Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80:891-897.
- Martínez E. 1994. Lacandoniaceae. En : Davidse, G., Sousa, M., Chater, A.O. (Edrs.). *Flora Mesoamericana*. Vol. 6 Alismataceae a Cyperaceae. UNAM-Missouri Botanical Garden-Natural History Museum, London, 19.
- Martínez E. y Ramos C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:128-135.
- Martínez E., Ramos C.H. y Chiang F. 1994. Lista florística de la Lacandona, Chiapas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 54:99-177.
- Palacios-Mayorga S. y Pérez-Silva E. 1993. Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae a new saprophytic angiospermae family. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 35:65-69.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichorn S.E. 1991. *Biología de las Plantas*. Reverté. Barcelona. España.
- Reyes-García A. y Sousa S. M. 1995. Una nueva localidad para la familia Lacandoniaceae y nuevos registros para la Reserva de Montes Azules, Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 57:117-119.
- Vázquez-Santana S., Engleman M., Martínez-Mena A., y Márquez-Guzmán J. 1998. Ovule and seed development of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *American Journal of Botany* 85(3):299-304.