

OBSERVACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA DEL NÚCLEO DE CÉLULAS DEL MERISTEMO DE RAÍZ DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) CON EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

María de Lourdes Segura-Valdez, Sarai de Jesús Cruz-Gómez,
Roberto López-Cruz, Reyna Lara-Martínez,
Lourdes Teresa Agredano-Moreno y Luis Felipe Jiménez-García

Lab. de Nanobiología Celular, Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias,
UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F.
E-mails: mlsv@hp.fciencias.unam.mx, sarichuy@yahoo.com.mx, robertolc@hotmail.com,
rlm@hp.fciencias.unam.mx, ltam@hp.fciencias.unam.mx, lfjg@hp.fciencias.unam.mx

RESUMEN

La estructura *in situ* del núcleo de la célula ha sido ampliamente estudiada con el microscopio de luz y con el microscopio electrónico. Recientemente se ha comenzado a utilizar el microscopio de fuerza atómica para este propósito. En este trabajo se presentan observaciones con el microscopio de fuerza atómica sobre la estructura del núcleo a partir de cortes semifinos de material preparado con métodos estándar para microscopía electrónica. En los núcleos de las células de la raíz de cebolla se observan elementos nucleares como los cúmulos de cromatina compacta, espacios que corresponden al nucleoplasma, poros nucleares y nucléolos. Las imágenes son similares a estructuras observadas con el microscopio de campo claro, aunque la resolución es mayor.

Palabras Clave: Cebolla, cromatina, microscopía de fuerza atómica (AFM), núcleo, nucléolo.

ABSTRACT

The *in situ* structure of the cell has been extensively studied by light and electron microscopy. Recently, atomic force microscopy has been also used to this aim. In this study, atomic force microscopy observations on the nuclear structure are presented from semi-thin sections of material prepared for standard methods of electron microscopy. In the onion root tip cell nuclei, clumps of compact chromatin, nucleoplasm space, nuclear pores and nucleoli are observed. Those images well correspond to those observed by bright field, although at higher resolution.

Key Words: Onion, chromatin, atomic force microscopy (AFM), nucleus, nucleolus.

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios de biología celular y molecular han contribuido a la concepción actual sobre la organización funcional del núcleo celular. El núcleo es un organelo que presenta una gran cantidad de compartimientos y es muy dinámico. La presencia de compartimientos fue vista a partir de los estudios de microscopía de luz y electrónica combinadas con métodos de

inmunolocalización e hibridación *in situ*¹⁻³. La noción de dinámica ha surgido principalmente de esos estudios⁴, aunque de manera más notable de estudios de microscopía de fluorescencia y confocal en los que se detecta y sigue en el tiempo la expresión de productos proteicos derivados de la expresión de genes acoplados en construcciones moleculares con la proteína fluorescente verde (GFP)⁵.

Nota: Artículo recibido el 17 de mayo de 2006 y aceptado el 19 de junio de 2006.

Recientemente, se ha utilizado el microscopio de fuerza atómica para el estudio del núcleo⁶⁻⁹ con el objetivo de analizar su

estructura a escala nanométrica y conocer las posibles aplicaciones de este instrumento en estudios que nos ayudarán a entender la estructura y función de este organelo, en donde reside la mayor parte del genoma de las especies eucariontes.

El microscopio de fuerza atómica fue inventado hace 20 años¹⁰. Su potencial de lograr resolución molecular y atómica lo han colocado en una posición fundamental para el análisis de la materia a escala nanométrica, sin el problema de la preparación de material que debe colocarse en un ambiente de vacío, como sucede con el microscopio electrónico. Sus aplicaciones en el área de materiales desde entonces ha sido intenso. En el área biológica, sin embargo, su uso es más reciente. Principalmente se ha utilizado en el análisis de moléculas aisladas y procesos moleculares *in vitro*¹¹. Más aún, su uso en el análisis *in situ* de la estructura celular es más reciente.

En este trabajo presentamos nuevas observaciones de la estructura nuclear de células del meristemo de la raíz de la cebolla (*Allium cepa*) con el microscopio de fuerza atómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron meristemos de raíces de cebolla obtenidos a partir de crecimiento de cebollas en agua, durante 3 a 4 días, a temperatura ambiente.

Procesamiento de muestras. Las muestras se procesaron de acuerdo con técnicas estándar para microscopía electrónica de transmisión descritas anteriormente¹². En breve, se tomaron los meristemos de la raíz de cebolla y se fijaron con glutaraldehído al 6% en amortiguador PBS a pH 7.2 durante 16 horas. Las muestras después se lavaron con PBS y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante varias horas. Posteriormente se enjuagaron y se deshidrataron en una serie de etanol a concentraciones graduales, finalizando con óxido de propileno. La preinclusión se llevó a cabo con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica, en proporción 1:1 durante 16 horas. Finalmente las muestras se incluyeron en resina epóxica durante 16 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de unos 200 nm de espesor, con una cuchilla de vidrio y utilizando un ultramicrotomo modelo Ultracut (Leica). Los cortes se montaron al calor sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina. Otros cortes se montaron sobre portaobjetos y no fueron teñidos.

Microscopía de luz. Los cortes semifinos teñidos se observaron en campo claro en un microscopio eclipse E800 (Nikon) con un objetivo 100X planapocromático. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3D FPG.

Microscopía de fuerza atómica. La observación con el microscopio de fuerza atómica se llevó a cabo de acuerdo a protocolos previamente descritos^{7,9}. De manera resumida, los

cortes semifinos teñidos o sin teñir se observaron con un microscopio de fuerza atómica modelo BioScope (Digital Instruments, Santa Barbara CA, USA) operando en modo de contacto con un controlador Nanoscope IIIa. El microscopio trabaja sobre un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon). Se utilizó un scanner de 100 µm y puntas de nitrógeno de silicio de 20-50 nm de radio de curvatura (modelo NP). Se utilizaron velocidades de barrido de entre 1.969 a 1.285 Hz, una fuerza de 10 nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias.

RESULTADOS

Microscopía de luz. Utilizando campo claro, las células del meristemo de la raíz se observan definidas por la presencia de pared celular y el citoplasma con vacuolas, así como con un núcleo voluminoso en donde se aprecia la cromatina reticulada y nucléolos prominentes (Figura 1).

Microscopía de fuerza atómica. Con el microscopio de fuerza atómica, en cortes semifinos se distinguen las células por la presencia de pared celular. A bajo aumento, en el interior de la célula se observa el citoplasma con vacuolas, así como el núcleo celular interfásico voluminoso (Figura 2). A mayor aumento, en el núcleo celular se observan discontinuidades a lo largo de la envoltura nuclear. En el interior del núcleo, se notan las hebras de cromatina compacta en forma de red, embebidas en el espacio del nucleoplasma. Asimismo, se nota un cuerpo redondo voluminoso (Figura 3). La proyección en tercera dimensión de esta figura muestra la textura de los elementos nucleares, en donde resalta de manera notable el nucléolo (Figura 4).

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos obtenido imágenes de células del meristemo de la raíz de cebolla con el microscopio de fuerza

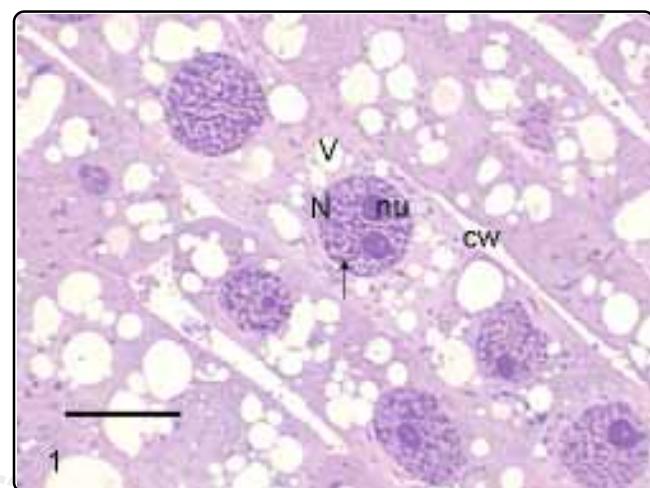


Figura 1. Micrografía de luz de células del meristemo de la raíz de cebolla. Las células se definen por la presencia de paredes celulares (cw). En las células, el citoplasma contiene vacuolas (V), un núcleo (N) grande y redondo con cromatina reticulada (flecha) y nucléolo (nu). Azul de toluidina. Barra, 10 µm.

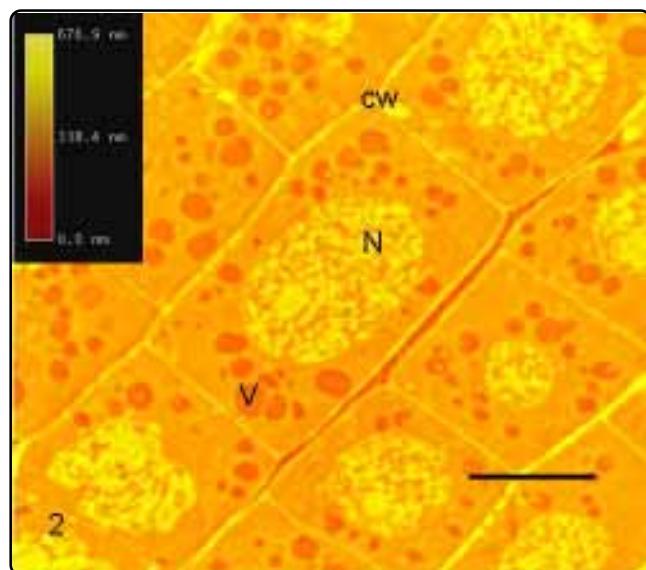


Figura 2. Micrografía de fuerza atómica de células del meristemo de raíz de cebolla. Aumento bajo en donde se observan las células con pared celular (cw). Se observan vacuolas (V) y núcleos (N) redondos. Barra, 10 μ m.

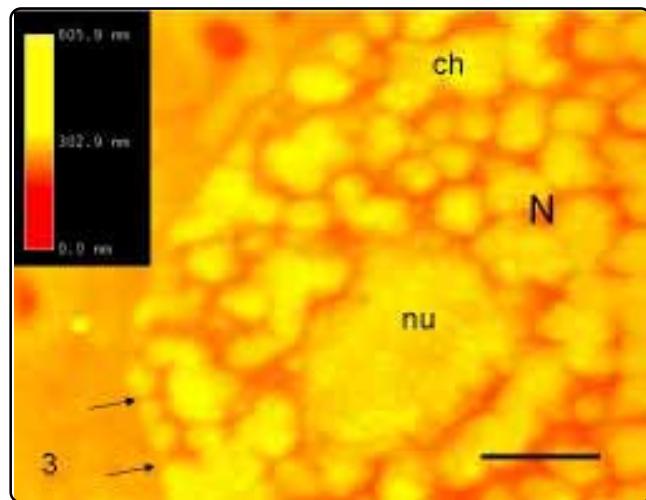


Figura 3. Micrografía de fuerza atómica de células del meristemo de raíz de cebolla. Aumento mayor en el que se observa un núcleo celular. Dentro del núcleo interfásico (N) se muestran tanto la cromatina reticulada (ch) como el nucléolo (nu) y los poros nucleares (flechas). Barra, 2 μ m.

atómica a partir de cortes semifinos de muestras preparadas para microscopía electrónica de transmisión.

Anteriormente se ha intentado utilizar un enfoque similar para observar la estructura celular¹³ y nuclear de otras plantas como *Lacandonia schismatica*⁶⁻⁷ y *Ginkgo biloba*⁸. En efecto, en el caso de *Ginkgo biloba*, utilizamos las imágenes de la cromatina reticulada como un criterio adicional al de microscopía de luz y microscopía electrónica.

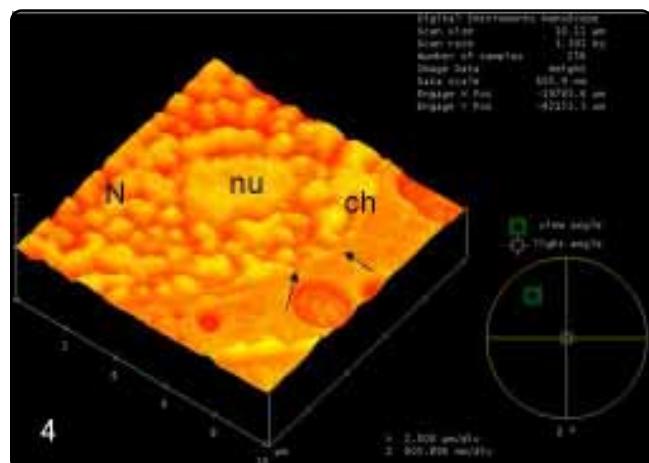


Figura 4. Micrografía de fuerza atómica en proyección 3D a partir de la figura 3. Dentro del núcleo interfásico (N) se muestran tanto la cromatina reticulada (ch) como el nucléolo (nu) y los poros nucleares (flechas).

Los criterios utilizados para concluir que se trata de estructuras celulares son:

- 1) Los límites de las células se definen por la presencia de paredes celulares evidentes.
- 2) Las dimensiones de las células son similares si se obtienen con microscopía de luz o de fuerza atómica.
- 3) Las células presentan en su interior espacios en el citoplasma que corresponden a vacuolas.
- 4) El organelo voluminoso en el interior celular corresponde por su forma redonda y posición central al núcleo.
- 5) En el interior del mismo se observa una red de filamentos gruesos que también se observan en microscopía de luz y que corresponden a lo que se ha descrito en la literatura como cromatina reticulada, presente en varios tipos celulares de diferentes plantas como la cebolla (*Allium cepa*), el ginkgo (*Ginkgo biloba*)⁸, *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*¹⁴. Las discontinuidades a lo largo de la envoltura nuclear corresponden a poros nucleares, como se ha mostrado anteriormente⁷. Además, los poros nucleares aislados han sido estudiados en detalle con el microscopio de fuerza atómica¹⁵.

Recientemente hemos estado estudiando las posibilidades del uso de la microscopía de fuerza atómica en el análisis de la estructura celular *in situ*. Para ello hemos utilizado un protocolo que consiste en la preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión y la generación de cortes de células y tejidos^{7,9}. De esta forma, aunque el microscopio es un instrumento de análisis de superficies, cada corte de las células representa una superficie cuya textura corresponde a su vez a la estructura de la célula, como hemos documentado previamente.

En este trabajo hemos obtenido imágenes de células del meristemo de raíz de cebolla, lo que abre mayores posibilidades de análisis a escala nanométrica debido a que se ha estudiado previamente con microscopía de luz y electrónica. En particular, hemos

validado el uso del microscopio de fuerza atómica en el estudio de estas células, lo que nos permitirá posteriormente profundizar en el estudio de estructuras nanométricas como los ribosomas o el nucléolo en resinas hidrosolubles o en cortes por congelación.

CONCLUSIONES

Las estructuras nucleares observadas con el microscopio de fuerza atómica en cortes semifinos de meristemos de la raíz de cebolla, corresponden a poros nucleares, cromatina compacta reticulada y nucléolos. Estas estructuras son similares a las observadas en este estudio con el microscopio de campo claro y a aquellas que se han publicado utilizando el microscopio electrónico. Este trabajo deja abierta la posibilidad de estudiar la estructura nuclear con alta resolución sin las limitantes de trabajar en condiciones de vacío.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por DGAPA-UNAM IN215106, IN221202.

REFERENCIAS

1. Spector, D.L. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 265-315 (1993).
2. Spector, D.L. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114**, 2891-2893 (2001).
3. Lamond, A.I. & Earnshaw, W.C. Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-553 (1998).
4. Jiménez-García, L.F. & Spector, D.L. *In vivo* evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* **73**, 47-59 (1993).
5. Misteli, T. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**, 843-847 (2001).
6. Jiménez-García, L.F. et al. Biología celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **62**, 5-14 (1998).
7. Jiménez-García, L.F. & Fragoso-Soriano, R.J. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* **129**, 218-222 (2000).
8. Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L. & Jiménez-García, L.F. Lacandonia granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. *Biol. Cell* **94**, 511-518 (2002).
9. Jiménez-García, L.F. & Segura-Valdez, M. de L. en *Atomic Force Microscopy: Methods and Applications*. Methods in Molecular Biology (eds. Braga, P.C. & Ricci, D.) 191-199 (Human Press, New Jersey, 2004).
10. Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, Ch. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933 (1986).
11. Hansma, H.G. et al. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. *J. Struct. Biol.* **119**, 99-108 (1997).
12. Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwand, L.A. *Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998).
13. Ushiki, T., Hitomi, J., Ogura, S., Umemoto, T. & Shigeno, M. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* **59**, 421-31 (1996).
14. Jiménez-García, L.F. et al. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* **75**, 101-110 (1992).
15. Stoffler, D., Fahrenkrog, B. & Aeby, U. The nuclear pore complex: From molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 391-401 (1999).