Análisis estructural del aparato fotosintético en plantas C_4 y CAM mediante microscopía de fluorescencia/confocal

Juan de Dios Alché Ramírez,
Adela Olmedilla Arnal
y María Isabel Rodríguez García*

Resumen

Se ha realizado un estudio histológico de hojas de diversas plantas C_4 y CAM mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía de barrido láser confocal. El análisis de la autofluorescencia emitida por los tejidos de la hoja constituye un método rápido, sencillo y no disruptivo para establecer la organización básica de los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. Dicho estudio ha permitido clasificar las plantas analizadas en varias categorías estructurales, además de sugerir un carácter mixto C_4/ CAM para algunas de ellas.

Los resultados obtenidos indican que la microscopía confocal, aparte de mejorar ostensiblemente la resolución respecto a la epifluorescencia estándar, probablemente permita desarrollar nuevas aplicaciones, como discriminar la distribución específica de los fotosistemas I y II en plantas C_4, o cuantificar la actividad de los diferentes componentes del aparato fotosintético.

La utilización de estas herramientas de Biología Celular permitirá, gracias a su facilidad de uso, diseñar experimentos destinados a ampliar el conocimiento de la fisiología de estas plantas, analizando la autofluorescencia específica emitida por su aparato fotosintético en distintas condiciones ambientales.

Summary

A histological study of leaves from several C_4 and CAM species has been carried out by using epifluorescence and confocal laser scanning microscopy. The analysis of the autofluorescence emitted by leaf tissues, represents a rapid, easy and non-disruptive method to determine the basic histological structure of both photosynthetic and non-photosynthetic tissues. The present study allowed us to classify the plants analyzed into several categories on the basis of their structure, as well as to suggest a mixed C_4/ CAM nature for some of them.

The results obtained here indicate that confocal microscopy, in addition to significantly improving the resolution over standard epifluorescence, may allow the development of new applications such as the discrimination of the specific distribution of photosystems I and II in C_4 plants, or the quantification of the activity of the different components of the photosynthetic apparatus.

The use of these Cell Biology tools, will allow the design of new experiments in order to improve the knowledge regarding the physiology of these plants, by analyzing the autofluorescence emitted by their photosynthetic apparatus under several environmental conditions.

Introducción y objetivos

La autofluorescencia de los tejidos vivos es un fenómeno natural que se debe a la presencia de metabolitos endógenos y compuestos fluorescentes orgánicos e inorgánicos. En las células vegetales, la autofluorescencia se deriva principalmente de la presencia de clorofila y lignina, y es especialmente evidente cuando se usan longitudes de onda de excitación en el rango del azul y el ultravioleta.

El uso de microscopía de epifluorescencia, y microscopía de barrido láser confocal puede contribuir a la caracterización de la estructura general de los tejidos, así como a la localización precisa de determinados componentes celulares (Zobel y March, 1993). La clorofila en concreto presenta un pico de absorción a 488 nm. La emisión de fluorescencia de los fotosistemas I y II es sin embargo diferencial (Edwards *et al.*, 2001), estando dominada por fluorescencia por encima de 700 nm en el caso del PSI, y por debajo de 700 nm en el caso del PSII, aunque existen fenómenos de reabsorción de ambas radiaciones emitidas. Un estudio detallado de los diferentes espectros de emisión ha permitido en algunas plantas C_4 obtener información sobre la distribución individual de ambos fotosistemas (Pfündel y Neubohn, 1999).

En este trabajo se pretende usar técnicas de microscopía de epifluorescencia y microscopía de barrido láser confocal para:

* Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de plantas. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1. 18008-Granada, España.

– implantar un método rápido, sencillo y no disruptivo que permita establecer la estructura histológica básica de los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos en plantas C_4 y CAM.
– Obtener datos sobre la distribución específica de ambos fotosistemas fundamentalmente en plantas C_4 que permitan su inclusión en los diversos subtipos funcionales.

Materiales y métodos

Para realizar el estudio, se obtuvieron secciones transversales (aprox. 0,5 mm) de hojas de las siguientes especies de plantas C_4: *Cyperus rotundus (Cyperaceae)*, *Cynodon dactylum (Poaceae)*, *Atriplex halimus (Chenopodiaceae)*, *Amaranthus blitoides (Amaranthaceae), Portulaca oleracea (Portulacaceae), Salsola opossitifolia* y *Salsola vermiculata (Chenopodiaceae)*, así como de *Sedum sediforme (Crassulaceae)* (planta con metabolismo CAM). Dichas secciones fueron obtenidas a mano con un escalpelo de acero. Las secciones se colocaron en portaobjetos con una gota de agua, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon TE-2000U utilizando las siguientes combinaciones de filtros:

– B-2A (EX 450-490 DM 505 BA 520) –azul–
– BV-2A (EX 400-440 DM 455 BA 470) –azul/violeta–
– G-2A (EX 510-560 DM 575 BA 590) –rojo–
– UV-2A (EX 330-380 DM 400 BA 420) –ultravioleta–.

Las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Coolpix 4500 a una resolución de 2272x1704.

Se realizaron observaciones complementarias con un microscopio de barrido láser confocal Nikon C1 utilizando un láser de argón (488 nm) y un módulo diascópico DIC para luz transmitida. Los filtros utilizados fueron los siguientes: (1DM 488/543/633; 2DM 530, 3DM 625, Em 515/30, 585/40 665LP). En todos los casos se utilizó un «pinhole» de pequeño tamaño (30 µm) y un objetivo Plan Apochromat 60.0x/1.40/0.21. Las imágenes fueron procesadas con el software Nikon EZ-C1 viewer (2.10).

Resultados y discusión

Las imágenes de epifluorescencia de las secciones de hojas de las distintas especies estudiadas se muestran en las Figs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. En cada una de dichas figuras se muestran los tejidos de la hoja tras irradiar consecutivamente con luz azul (a), azul/violeta (b), roja (c) y ultravioleta (d).

La irradiación con luz azul (a) produce autofluorescencia verdosa en las paredes celulares, observándose el tejido fotosintético como fluorescencia rojiza. Una imagen similar se produce cuando se irradia con luz azul/violeta (b), aunque la autofluorescencia de las paredes celulares aparece en este caso reducida con respecto a la luz azul. La irradiación con luz roja no produce una discriminación precisa de las estructuras tisulares (c), mientras que la fluorescencia azul de las paredes celulares tras irradiar con luz ultravioleta (d) muestra la distribución general de los tejidos, entre los que destacan fundamentalmente los tejidos conductores. La utilización alternativa de dichas longitudes de onda permite de forma diferencial analizar la estructura tisular de la hoja por una parte, y discriminar donde se encuentran los tejidos fotosintéticos, especialmente en aquellas combinaciones de filtros que más se ajustan a los espectros de absorción de la clorofila (azul y azul/violeta).

La primera observación claramente apreciable es que la anatomía de las hojas C_4 estudiadas, presenta la denominada estructura «Kranz», que difiere fundamentalmente de la de estructura clásica y bien conocida (asimétrica dorsiventral) de las plantas C_3. Los cloroplastos de las plantas C_3 son de estructura homogénea, mientras que pueden localizarse dos tipos de cloroplastos en plantas C_4: por una parte, las células del mesófilo contienen cloroplastos con la estructura clásicamente descrita mientras que las células de la denominada vaina poseen cloroplastos sin grana, es decir, cloroplastos aparentemente «deficientes» en su funcionalidad. Esta peculiaridad no afecta al ciclo de Calvin, puesto que únicamente afecta a las reacciones lumínicas de la fotosíntesis. En estas plantas, la primera unión del dióxido de carbono (reacción de Hatch-Slack) ocurre en las células del mesófilo, mientras que la incorporación en carbohidratos (ciclo de Calvin) tiene lugar en las células de la vaina. Ambos procesos de la fotosíntesis están separados espacialmente en este tipo de plantas, y ambos tipos de tejidos, también denominados PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue —mesófilo— y PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue —vaina—, son claramente distinguibles debido a su autofluorescencia diferencial.

TABLA 1

Resumen de las características observadas en los tejidos fotosintéticos de las especies analizadas

Especie	*Familia*	*Tipo*	*Subtipo morfológico. Características*
Cyperus rotundus	*Cyperaceae*	C_4	Estructura concéntrica monocapa de la vaina y el mesófilo, típica Kranz. Autofluorescencia mesófilo > autofluorescencia vaina
Cynodon dactilum	*Gramineae*	C_4	Estructura concéntrica monocapa de la vaina y el mesófilo, típica Kranz. Kranz autofluorescencia mesófilo < autofluorescencia vaina
Atriplex halimus	*Chenopodiaceae*	C_4	Kranz modificada: Estructura concéntrica monocapa de la vaina. Mesófilo monocapa rellenando todo el espacio central de la hoja. Autofluorescencia mesófilo < autofluorescencia vaina
Amaranthus blitoides	*Amaranthaceae*	C_4	Kranz modificada: Estructura concéntrica monocapa de la vaina y mesófilo multicapa con células Kranz y no-Kranz. autofluorescencia mesófilo < autofluorescencia vaina
Salsola opossitifolia	*Chenopodiaceae*	C_4	Kranz tipo Salsoloide con un mesófilo en empalizada, vaina monocapa y tejido almacenador de agua con cloroplastos. Autofluorescencia mesófilo ≤ autofluorescencia vaina
Salsola vermiculata	*Chenopodiaceae*	C_4	Kranz tipo Salsoloide con un mesófilo en empalizada, vaina monocapa y tejido almacenador de agua con cloroplastos. autofluorescencia mesófilo ≤ autofluorescencia vaina
Portulaca oleraceae	*Portulacaceae*	C_4/CAM	Kranz atípica (hojas con constitución crasa y presencia de células mucilaginosas). Vaina concéntrica monocapa. Mesófilo radial monocapa. Autofluorescencia mesófilo < autofluorescencia vaina
Sedum sediforme	*Crassulaceae*	CAM	Estructura CAM: mesófilo con grandes células altamente vacuoladas e indiferenciadas. Cloroplastos periféricos en dichas células

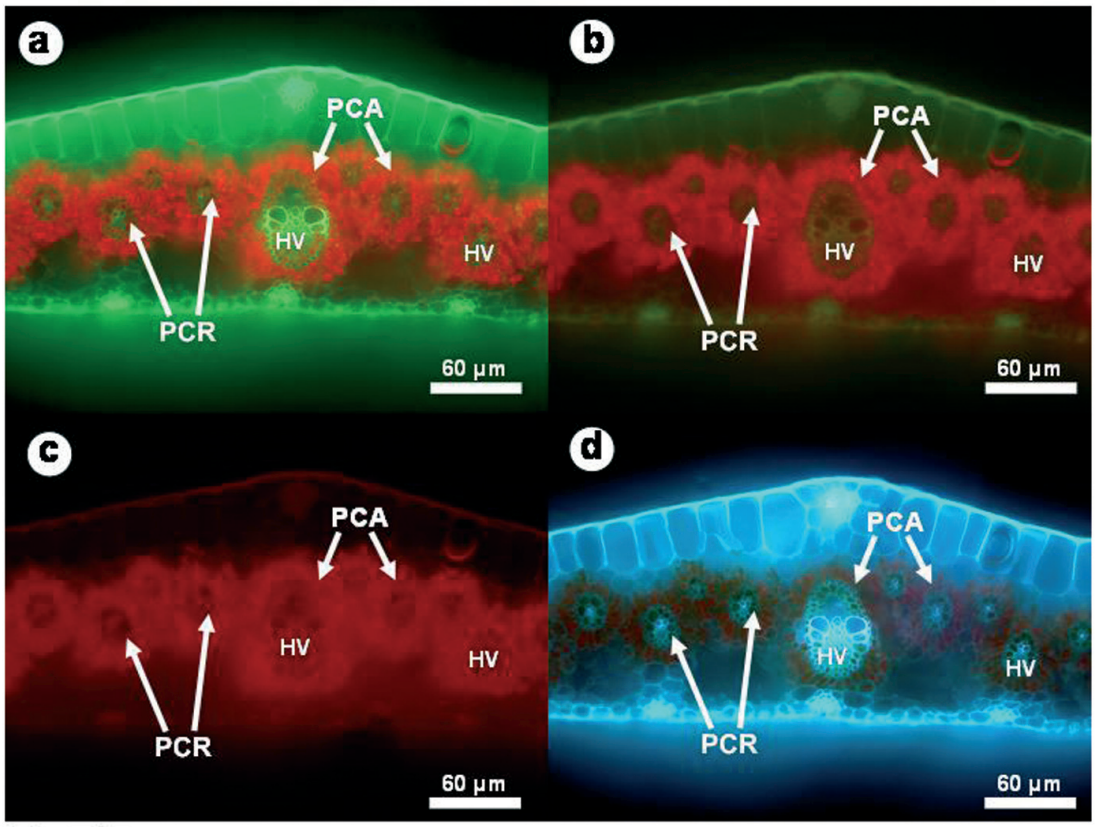
En general, las plantas C_4 poseen la estructura «Kranz», claramente discernible en cuanto que el mesófilo y la vaina se localizan formando anillos concéntricos alrededor de los haces vasculares. Sin embargo en muchos casos, esta estructura típica no es tan claramente identificable, o presenta ligeras modificaciones como se describe en algunas de las especies analizadas en este trabajo y se resume en la Tabla 1.

La observación de las estructuras fotosintéticas mediante microscopía confocal permite obtener detalles estructurales de mayor resolución que las técnicas de epifluorescencia estándar (Figs. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16). La realización de secciones ópticas permite además la realización de otra serie de técnicas que incluyen la cuantificación de la señal obtenida, y la reconstrucción 3D de los tejidos, como se muestra en algunos de los materiales adicionales incluidos en el CD (adjunto a este libro).

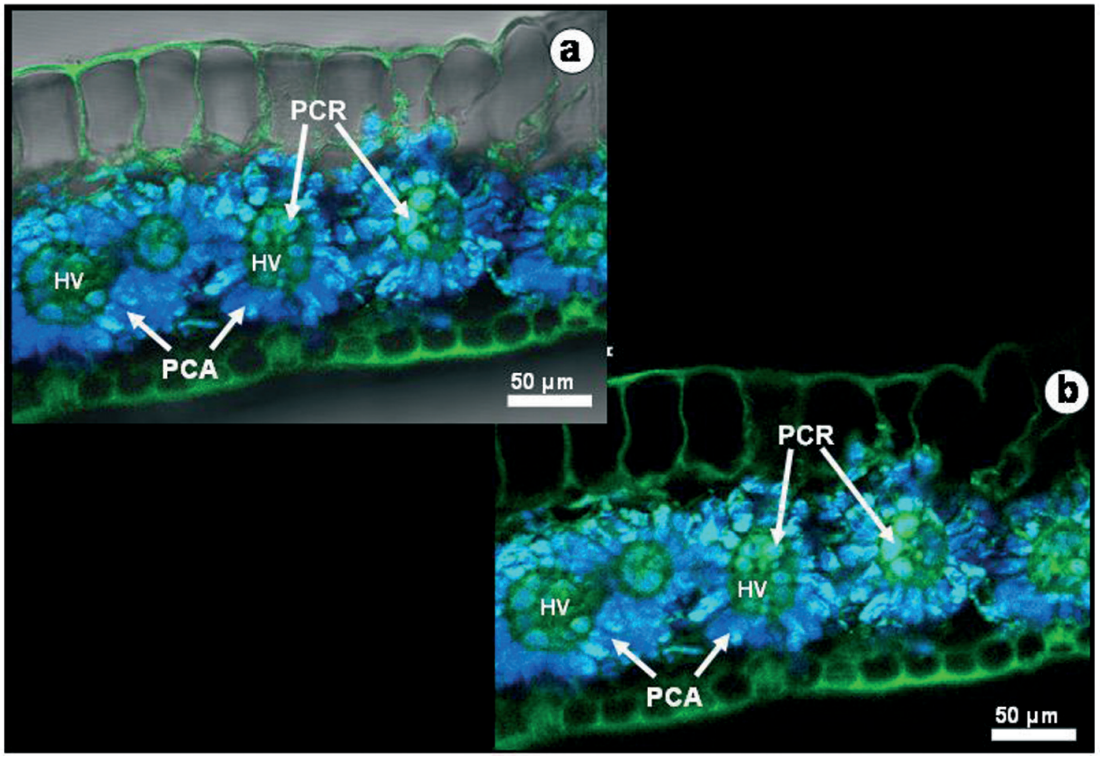
Cyperus rotundus (*Cyperaceae*)

En el caso de *Cyperus rotundus* (Figs. 1 y 2), se aprecia claramente la estructura Kranz, integrada por anillos concéntricos formados por monocapas de células del mesófilo y de la vaina respectivamente, alrededor de los haces vasculares, que contienen esclerénquima. No se aprecia lamela suberizada en las células de la vaina. Se observan claramente ambas epidermis, formadas por células de gran tamaño en el haz y células de pequeño tamaño en el envés.

Mediante microscopía confocal se puede apreciar el aspecto diferencial de ambos tipos de células, tanto en su forma (redondeada los de la vaina, más elongadas las del mesófilo) como en la intensidad de su autofluorescencia (relativamente superior en células del mesófilo que en las de la vaina).



1

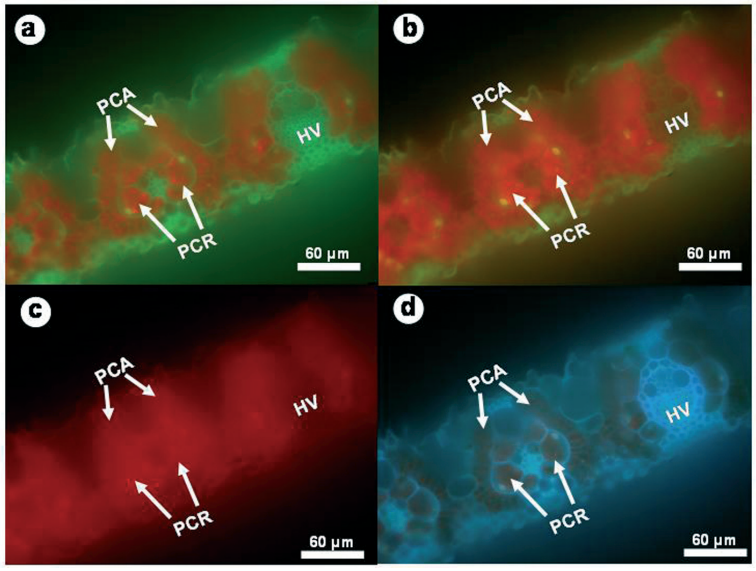


2

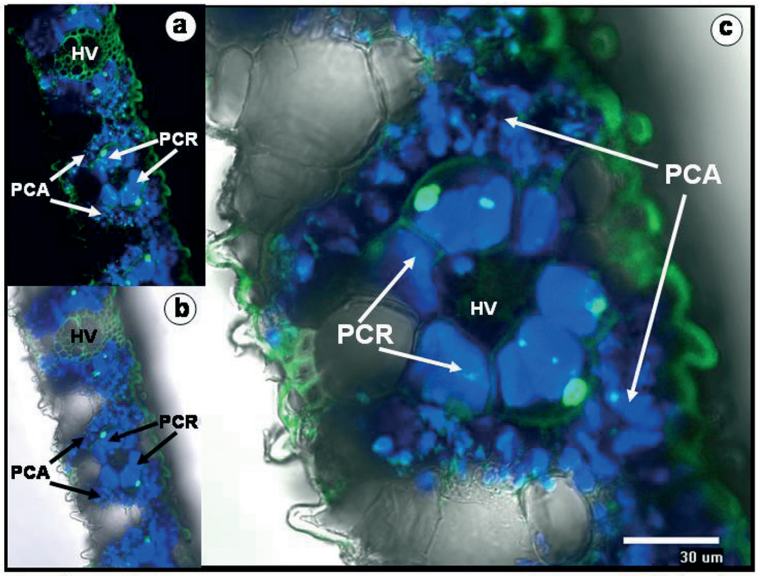
Figuras 1 y 2. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Cyperus rotundus* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 1a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con y sin luz transmitida (Fig. 2a y b, respectivamente). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue. PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares.

Cynodon dactilon (*Poaceae*)

La mencionada estructura Kranz está igualmente bien representada en *Cynodon dactylum* (Figs. 3 y 4) donde se puede apreciar que la capa única de tejido fotosintético reductor de carbono (PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue) alrededor de los haces vasculares primarios se interrumpe abaxialmente. Las células del PCR carecen de lamela suberizada. Algunos autores describen esta especie como C_4 de tipo centrípeto (Watson y Dallwitz, 1992 y posteriores). Se aprecia mesófilo con clorénquima radiado, atravesado por columnas de células del mesófilo, que constituyen una única capa. Todos los haces vasculares (HV) van acompañados de esclerénquima. Las imágenes de microscopía confocal muestran ambos tejidos compuestos por células claramente diferenciadas. En este caso las células de la vaina, de aspecto redondeado, son mayores en tamaño y poseen mayores niveles de autofluorescencia que las del mesófilo. Epidermis del envés con micropelos.



3

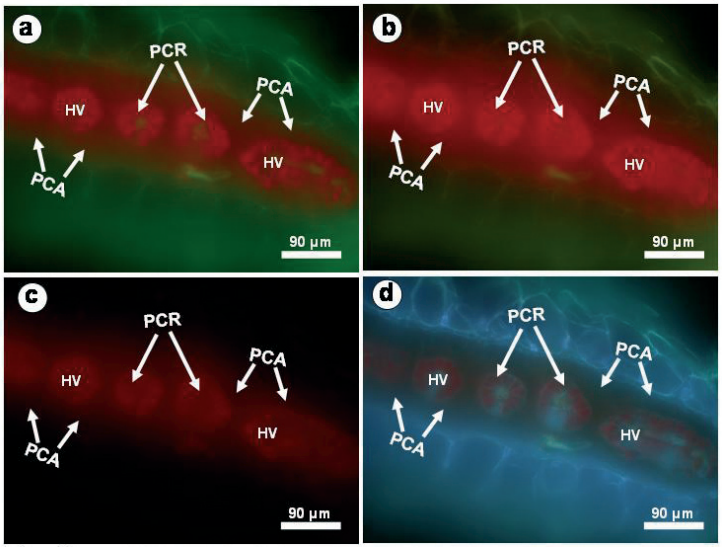


4

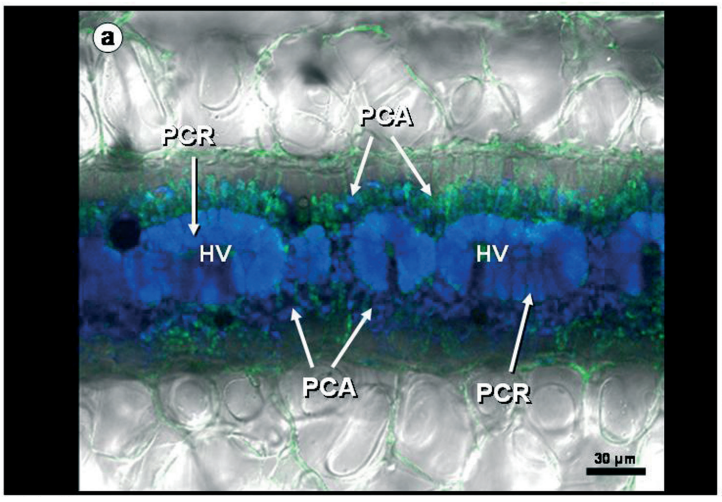
FIGURAS 3 y 4. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Cynodon dactilum* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 3a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con (Fig. 4b y c) y sin luz transmitida (Fig. 4c). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue. PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares.

Atriplex halimus (Chenopodiaceae)

La familia *Chenopodiaceae* es especialmente interesante en relación a la amplia variedad que presentan las estructuras responsables de la asimilación del carbono en sus diferentes especies. Dicha familia incluye desde especies estrictamente C_3 o C_4, a intermedias C_3/C_4 y C_4/CAM (Voznesenseskaya *et al.*, 1999). En el caso de *Atriplex halimus*, la estructura Kranz típica descrita en las especies anteriores presenta una ligera modificación (Figs. 5 y 6): el tejido fotosintético se engloba como un compartimiento central, rodeado de ambas epidermis integradas por células de gran tamaño. En este caso, la vaina está compuesta por una capa de células de gran densidad y altamente autofluorescentes que rodean a los tejidos conductores, con la excepción de la zona abaxial. El mesófilo se muestra como una única capa alrededor de la vaina y de los haces vasculares, pero que completa todo el espacio central de la hoja. Sus células son estructuralmente muy diferentes a las de la vaina, mucho más elongadas, y con mucha menos autofluorescencia. La estructura anatómica de *Atriplex* ya ha sido ampliamente descrita por diversos autores, y recientemente revisada por Jacobs (2001) mediante otras técnicas de examen. Los datos aportados por dicho autor son plenamente consistentes con nuestras observaciones.



5

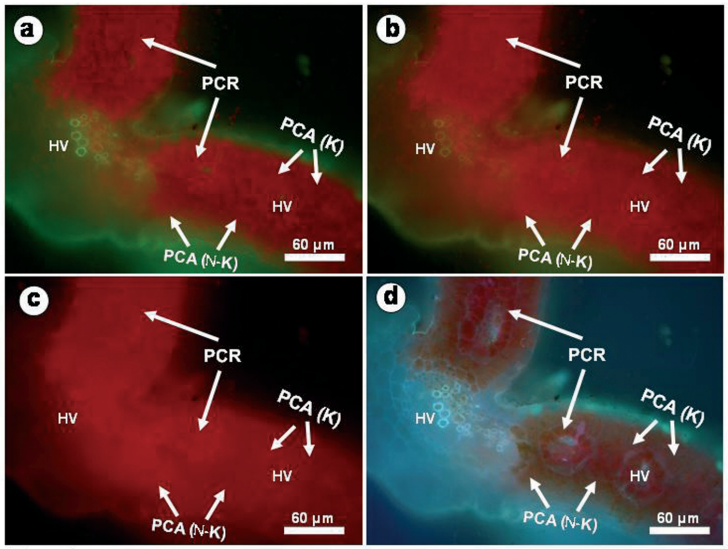


6

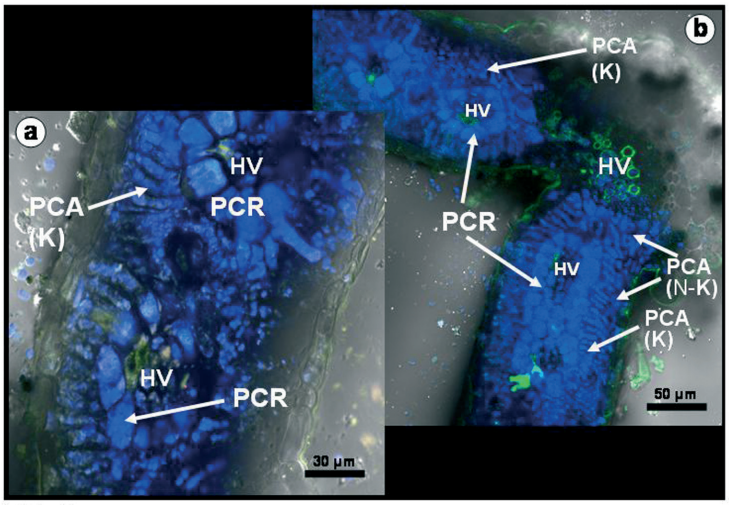
Figuras 5 y 6. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Atriplex halimus* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 5a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con luz transmitida (Fig. 6). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue. PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares.

Amaranthus blitoides (Amaranthaceae)

La estructura anatómica del aparato fotosintético de diversas especies de *Amaranthus* ha sido descrita en detalle mediante microscopía óptica (Fisher y Evert, 1982) y electrónica (Hong *et al.*, 2005). La estructura que mostramos en el presente trabajo, correspondiente a *Amaranthus blitoides*, se ajusta bastante a dicha descripción (Figs. 7 y 8): las células de la vaina integran una única capa de forma concéntrica alrededor de los haces vasculares. La mayoría de las células del mesófilo (denominadas células Kranz por dichos autores), están en contacto directo con la vaina, aunque algunas (denominadas células no-Kranz en el mencionado trabajo) no están en contacto con la vaina. Dichas células son especialmente prominentes en áreas en las que forman una red de células fundamentalmente orientadas en horizontal, justo debajo de la epidermis. La autofluorescencia de las células de la vaina, y el tamaño de estas células, es superior en todo caso al de las células del mesófilo (tanto en células Kranz como no-Kranz). Estos dos tipos de células del mesófilo son indistinguibles en cuanto a características morfológicas y nivel de autofluorescencia entre sí.



7

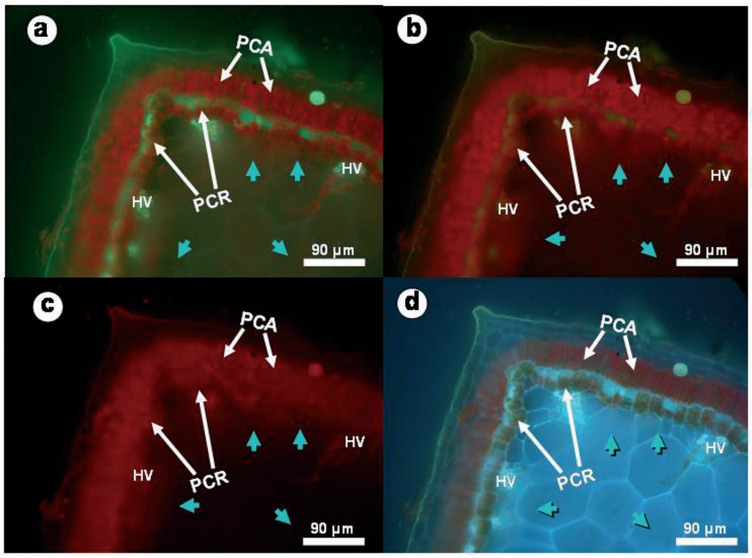


8

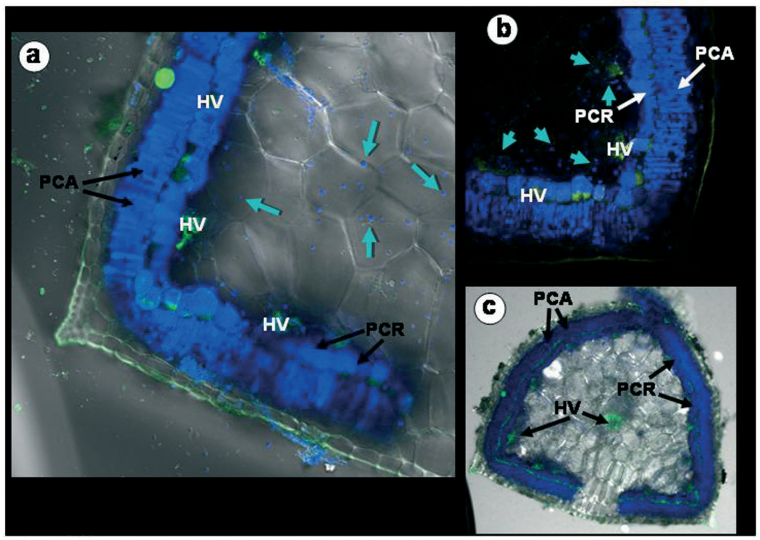
FIGURAS 7 y 8. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Amaranthus blitoides* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 7a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con luz transmitida (Fig. 8). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue PCA(K): Photosynthetic Carbon Assimilation tissue con células tipo Kranz. PCA(N-K): Photosynthetic Carbon Assimilation tissue con células tipo no-Kranz. HV: haces vasculares.

Salsola opossitifolia y Salsola vermiculata (Chenopodiaceae)

Ambas especies presentan en sus hojas la denominada anatomía Krankz de tipo Salsoloide, definida por Carolin *et al.* (1975). Esta estructura se caracteriza por la presencia de dos capas clorenquimatosas (un mesófilo en empalizada y una capa correspondiente a la vaina) de forma continua alrededor de la periferia de la hoja (Figs. 9-12). Hay una capa de células redondeadas subepidermales. Se observa un haz vascular mayor, inmerso en el centro del tejido que almacena agua y que forma la región central de la hoja. En dicho tejido se observan igualmente numerosos cloroplastos. También se observan haces conductores menores justo bajo la vaina. La autofluorescencia mostrada por la vaina es netamente superior a la mostrada por el mesófilo en empalizada en el caso de *S. vermiculata*, con sólo ligera diferencia en intensidad entre ambas capas en el caso de *S. oppositifolia*. En ambos casos la morfología de las



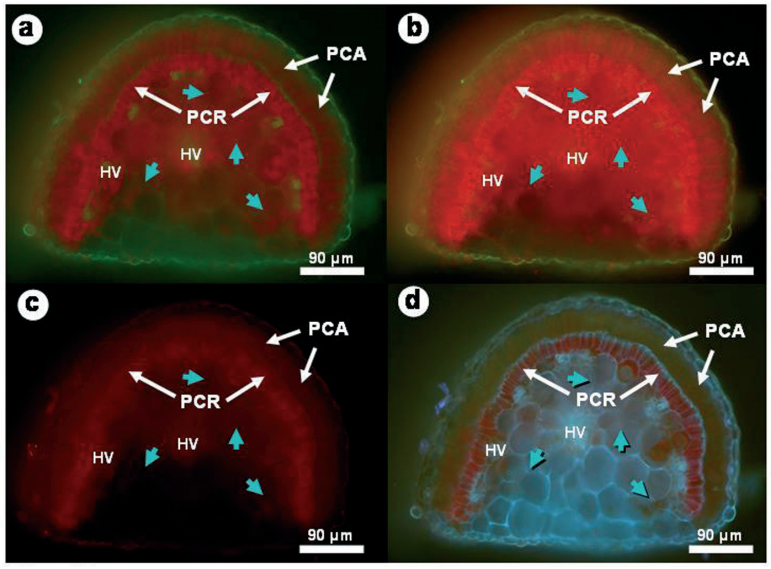
9



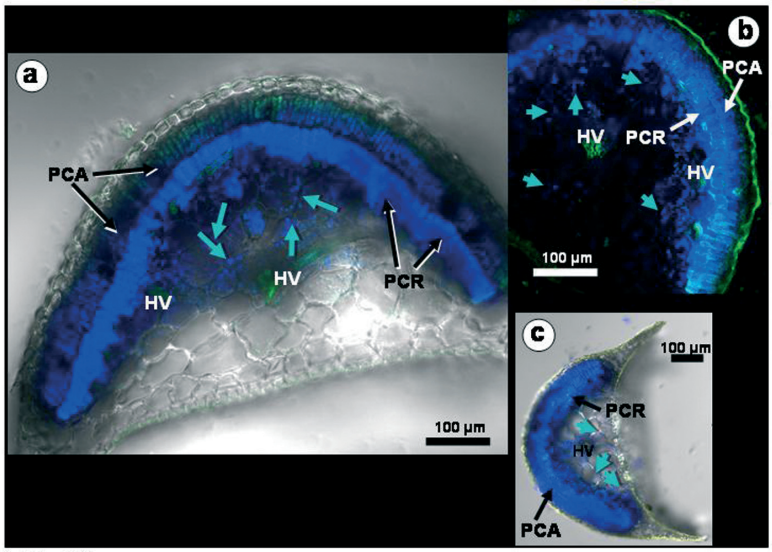
10

Figuras 9 y 10. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Salsola opossitifolia* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 9a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con (Fig. 10a, c) y sin luz transmitida (Fig. 10b). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares. Las flechas azules muestran la localización de cloroplastos presentes en el tejido almacenador de agua.

células integrantes de ambas capas es bastante diferente. Estructuras de este tipo han sido descritas en detalle en varias especies de la tribu *Salsoleae* por Voznesenskaya *et al.* (1999). Las especies de esta tribu poseen, como ya ha sido descrito, un tejido que almacena agua y que ocupa el centro de las estructuras asimiladoras. La extensión de este tejido varía entre aproximadamente un 25 a un 45% del volumen total de la hoja. Dependiendo de la especie, el número de cloroplastos presentes en las células de este tejido puede ser desde casi nulo hasta ser incluso superior en densidad a las células del mesófilo o de la vaina. Voznesenskaya *et al.* (1999) revisan y discuten sobre la base de sus observaciones la posibilidad de que dicho tejido contribuya a la asimilación del carbono y sobre el origen del CO_2 utilizado por este tejido. También se discute en dicho trabajo la posibilidad sugerida por algunos autores de la existencia de un cierto grado de metabolismo tipo CAM (Crassulacean Acid Metabolism) en las células de este tejido de almacén de agua.



11

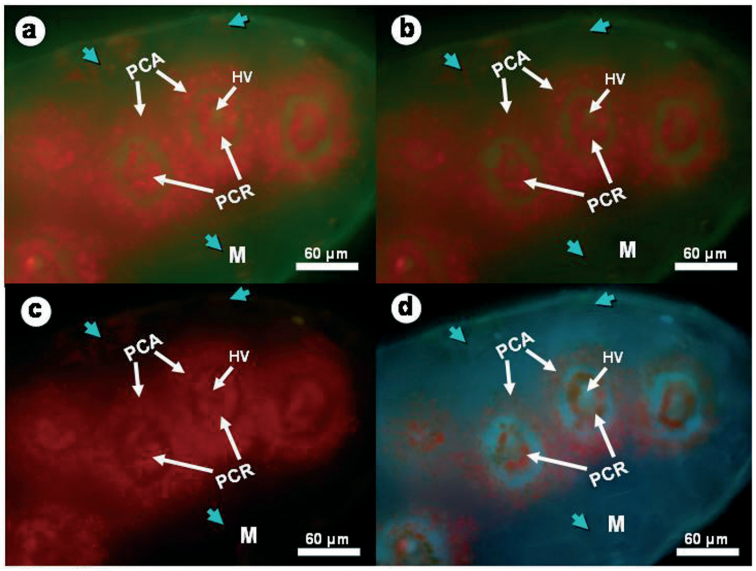


12

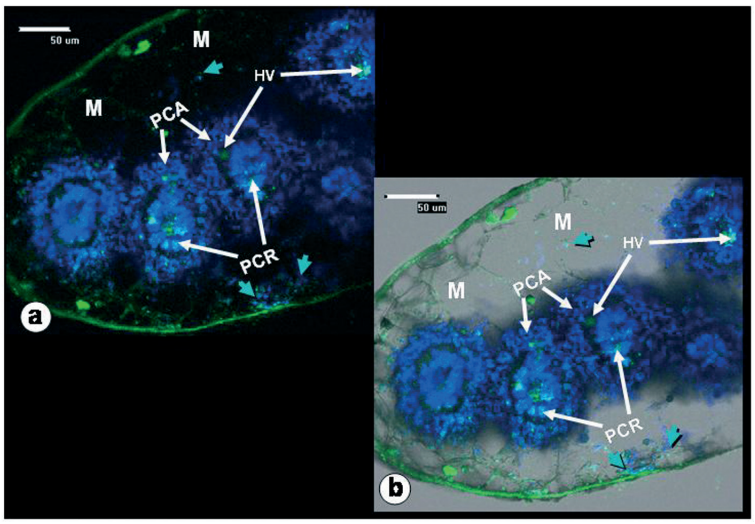
FIGURAS 11 y 12. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Salsola vermiculata* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 11a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con (Fig. 12a, c) y sin luz transmitida (Fig. 12b). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares. Las flechas azules muestran la localización de cloroplastos presentes en el tejido almacenador de agua.

Portulaca oleracea (Portulacaceae)

En el caso de *Portulaca oleracea* (Fig. 13 y 14) se puede observar estructura C_4 (Kranz) ligeramente atípica, ya que las hojas tienen una constitución crasa. No se diferencian claramente haces vasculares primarios y menores. Dichos haces carecen de células de transferencia del floema. Watson y Dallwitz (1992) y Guralnick y Jackson (2001) describen una fisiología intermedia entre C_4 y CAM para esta especie, así como la presencia de células mucilaginosas o células de almacén de agua en el mesófilo. La vaina está integrada por una capa única de células alrededor de los haces vasculares. Las células del mesófilo también tienen disposición radial alrededor de la vaina, aparentemente en una única capa de células, aunque existe discontinuidad entre vaina y mesófilo debido a la presencia de una estructura intermedia. También aparecen algunos cloroplastos periféricos en las células de almacén de agua.



13



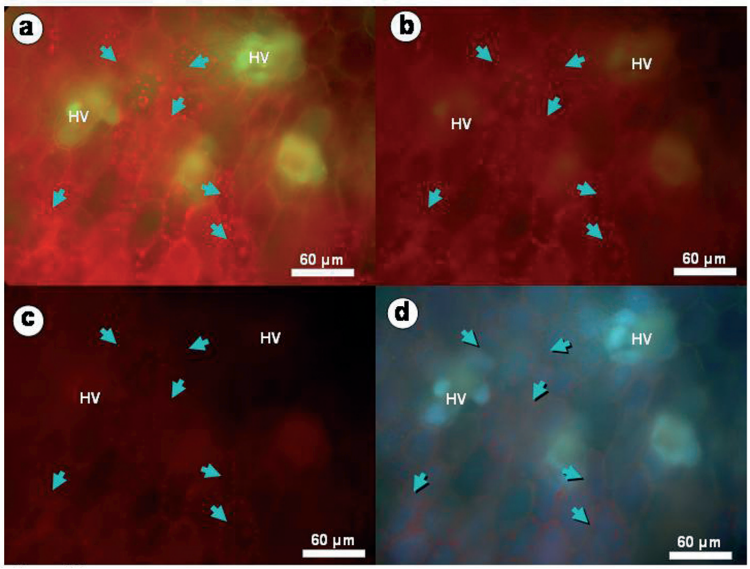
14

Figuras 13 y 14. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Portulaca oleracea* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 13a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal (Fig. 14a) y microscopía confocal y luz transmitida (Fig. 14b). PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue. HV: haces vasculares. Las flechas azules muestran la localización de cloroplastos presentes en células mucilaginosas/tejido almacenador de agua.

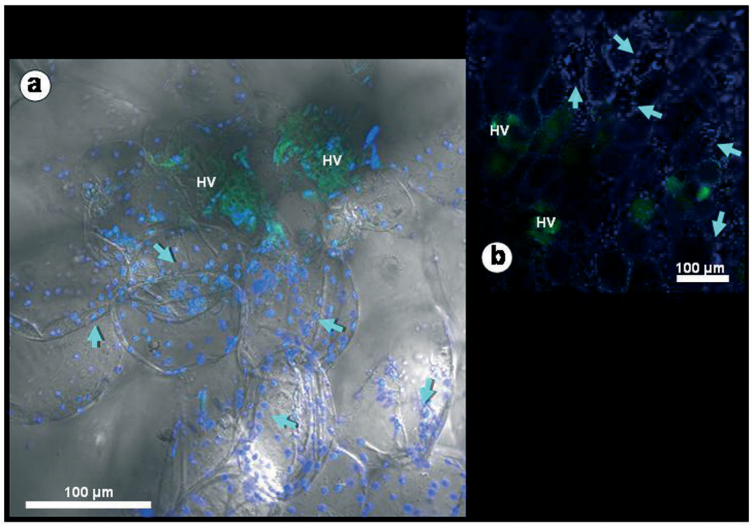
Sedum sediforme (Crassulaceae)

Esta especie corresponde a una planta de tipo suculento con metabolismo de tipo CAM, denominado de esa forma por ser frecuente entre las especies de esta familia. Las reacciones químicas de acumulación del CO_2 son similares a las de las plantas C_4, aunque en este caso la fijación del CO_2 y su asimilación no están separadas espacialmente, sino en el tiempo. Las plantas CAM se dan esencialmente en regions áridas. La apertura de los estomas para la captación del CO_2 está siempre conectada con grandes pérdidas de agua. Con objeto de inhibir esta pérdida durante la insolación intensa (la transpiración vía cutícula permanece intacta) estas plantas han desarrollado un mecanismo que permite la captación de CO_2 durante la noche. El dióxido de carbono prefijado es almacenado en vacuolas como malato (e isocitrato), y es usado durante el día para la fotosíntesis.

La anatomía de estas plantas está por tanto altamente especializada para esta función y ha sido descrita en detalle en diversas especies (Nelson *et al.*, 2005). En el caso de *Sedum sediforme* (Figs. 15 y 16), las gruesas hojas constan de una epidermis con estomas, y un



15



16

FIGURAS 15 y 16. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Sedum sediforme* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 15a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con y sin luz transmitida (Figs. 16 a y b respectivamente). Las flechas azules muestran la localización de cloroplastos presentes en células indiferenciadas del mesófilo. HV: haces vasculares.

mesófilo homogéneo con numerosos células CAM densamente empaquetadas. No aparecen, como ocurre en las plantas C_3 y C_4 varios tipos celulares claramente diferenciados, sino que las células del mesófilo son bastante indiferenciadas entre sí. Contienen una gran área vacuolada, que aporta a la planta una elevada capacidad de acumulación de ácidos C_4 y de agua. Los cloroplastos son claramente visibles en la periferia de estas células, gracias a su autofluorescencia tras excitar con diversas longitudes de onda. Se aprecian haces vasculares secundarios a lo largo de toda la estructura del mesófilo.

Las descripciones anteriores, realizadas sobre la base de la emisión de autofluorescencia tras utilizar diversas longitudes de onda de excitación, en microscopía de epifluorescencia, y tras excitar con un láser 488 en microscopía confocal, son comparables en resolución, y en muchos casos ofrecen más detalles estructurales que otras técnicas de observación utilizadas frecuentemente en la literatura con el mismo objetivo. Algunas de las técnicas mayoritariamente utilizadas para discriminar entre los tejidos fotosintéticos y la estructura general de la hoja, incluyen: i) uso de tinciones específicas de almidón con sales de yodo (Osmond, 1974), ii) microscopía óptica de luz transmitida tras fijar las hojas con etanol, teñir con safranina y montar (Fisher y Evert, 1982), iii) inmunolocalización a microscopía óptica y electrónica de enzimas específicos de la fotosíntesis como RUBISCO, RuBPCO, PEPC, NAD-ME y NADP-ME (ej. Castrillo *et al.*, 1997; Voznesenskaya *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2005), iiii) fijación, inclusión de las hojas y observación de secciones finas y ultrafinas a microscopía óptica y electrónica (Gutierrez *et al.*, 1974; Crookston y Ozbun, 1975; Lawton, 1988).

Son muy limitadas las referencias que hemos conseguido encontrar en la literatura sobre el uso de la autofluorescencia y la microscopía confocal para la descripción morfológica de los tejidos fotosintéticos en plantas C_4 y CAM (ej. Pfündel y Neubohn, 1999; Nelson *et al.*, 2005). Sin embargo, el potencial de este tipo de técnicas es muy elevado, y a ello se una la facilidad de preparación de las muestras, condiciones ambas que permiten el diseño de muy diversos experimentos.

Como ejemplos cabe citar que muchas plantas tienen fisiología intermedia C_3-C_4 o C_4-CAM, desplazada temporalmente, desplazada en diferentes órganos, o dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentra la planta como la humedad atmosférica, temperatura, insolación etc. Los métodos mostrados aquí, por su simplicidad, permiten un estudio detallado en numerosos órganos y a diferentes tiempos, prácticamente sin preparación previa de las muestras, lo que facilita enormemente el estudio de dichos cambios.

Una ventaja adicional de este tipo de técnicas es su posible utilización conjunta con otra serie de técnicas, por ejemplo con la inmunolocalización de enzimas relacionadas con la fijación y asimilación del carbono, mediante técnicas igualmente de fluorescencia.

Durante los pasados 150 años han ido desarrollándose numerosos métodos de tinción para especimenes vegetales, que incluyen el uso de colorantes tan comunes como la safranina, hematoxilina, Fast Green, Orange G, Alcian Blue… Numerosos textos documentan las posibles utilizaciones de estos colorantes y detallan sus protocolos de utilización. Muchos de estos colorantes son además altamente fluorescentes, de forma que muchas tinciones clásicas como la safranina, el anaranjado de acridina, rodamina etc., además de algunos fluorocromos específicos como el sirofluor (específico para teñir calosa), o el calcofluor (tiñe específicamente paredes celulares), producen una fluorescencia intensa que puede ser utilizada también con fines discriminatorios y analíticos del tejido fotosintético.

El uso de señales fluorescentes, y la elevada versatilidad de las técnicas de análisis de imágenes asociadas a microscopía de fluorescencia, que se multiplica en el caso de la microscopía confocal permite además prever muchas otras aplicaciones entre las que citamos solamente algunas:

- La señal autofluorescente es fácilmente cuantificable utilizando el software adecuado, y permite la discriminación anatómica sobre la base de dicha cuantificación. Como ejemplo, la Figura. 17 muestra el análisis de la emisión total de fluorescencia determinando un cambio de color a unos determinados niveles de saturación. Este método permite fácilmente comparar los niveles de emisión de la vaina y el mesófilo.
- Pfündel y Neubohn (1999) utilizaron microscopía confocal para discriminar la localización de los fotosistemas I y II en plantas. Aunque en el presente trabajo no es posible discriminar la emisión de fluorescencia de los fotosistemas I

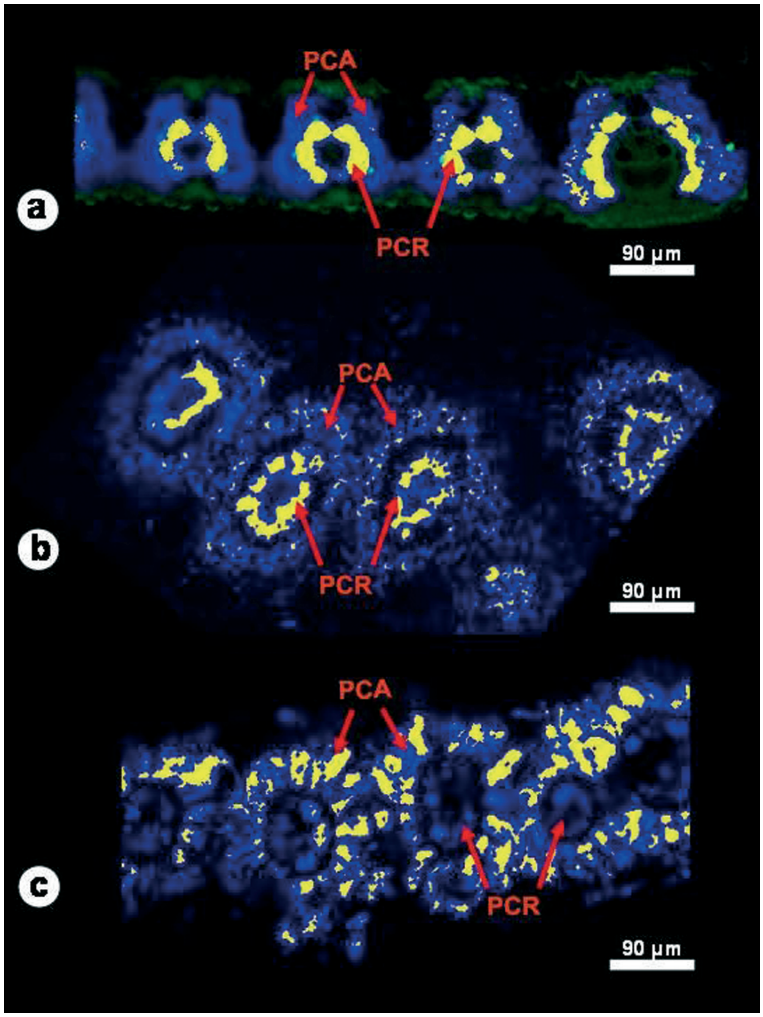


FIGURA 17. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Cynodon dactylon* (a), *Portulaca oleracea* (b) y *Cyperus rotundus* (c) observada mediante microscopía confocal. En amarillo se muestran las regiones con saturación del nivel de fluorescencia emitida. PCR: Photosynthetic Carbon Reduction tissue PCA: Photosynthetic Carbon Assimilation tissue.

y II debido a que se carece de un sistema de microscopía espectral y los filtros barrera utilizados no discriminan entre fluorescencia por encima y por debajo de 700 nm, el método descrito puede tener un elevado interés para correlacionar la localización de ambos fotosistemas y el subtipo de planta C_4 (NADP-ME, NAD-ME, PEP carboxiquinasa), el carácter intermedio C_4/CAM o ciertas características inusuales, como la fotosíntesis C_4 en ausencia de estructura anatómica de tipo Kranz (Voznesenskaya *et al.*, 2002).

– El control digital de la microscopía confocal permite una clara separación de las diferentes señales de emisión fluorescente en distintos canales, permitiendo una mejor discriminación de la información. Dichos sistemas realizan además secciones ópticas de forma que pueden obtenerse imágenes perfectamente claras y nítidas del interior de preparaciones de hojas completas o de secciones gruesas de dichas hojas, como se muestra en el presente trabajo. Dichas secciones pueden ser realizadas secuencialmente a lo largo del eje z, con la utilización de unidades motorizadas, y utilizarse posteriormente para realizar reconstrucciones tridimensionales del tejido. Algunas de estas reconstrucciones se aportan en el presente volumen como material adicional en formato video (ver CD adjunto).

Es por tanto amplísimo el potencial de podemos prever para estas técnicas en cuanto al análisis de la fisiología de la fotosíntesis. Estamos seguros que en los años futuros, con su desarrollo progresivo, constituirán herramientas imprescindibles para dicho estudio.

Agradecimientos

Agradecemos a Julio López Gorgé allá donde se encuentre, el habernos introducido en este maravilloso mundo de las relaciones fisiológicas y adaptativas de estas plantas con su entorno, así como su dirección, ánimo e interés durante el tiempo en que nos condujo a lo largo del proyecto de la Fundación Ramón Areces que respalda esta obra homenaje. Sabemos que este trabajo habría sido especialmente de su interés, y en él hemos puesto igualmente el nuestro.

Finalmente, gracias a la Fundación Ramón Areces por la financiación de este estudio, y especialmente a Ana Belén Robles Cruz por el material botánico del mismo.

Referencias bibliográficas

CAROLIN, R.C.; JACOBS, S.W.L. y VESK, M., 1975. «Leaf structure in Chenopodiaceae». *Botanische Jahrbücher fur Systematishe Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 95, 226-255.

CASTRILLO, M.; ASO, P.; LONGART, M. y VERMEHREN, A., 1997. «In situ immunofluorescent localization of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in mesophyll of C4 dicotyledonous plants». *Photosynthetica* 33, 39-50.

CROOKSTON, R.K. y OZBUN, L., 1975. «The occurrence y ultrastructure of Chloroplasts in the phloem parenchyma of leaves of C4 dycotiledons». *Planta* 123, 247-255.

EDWARDS, G.E.; FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. y C. OSMOND, B., 2001. «What Does It Take to Be C_4? Lessons from the Evolution of C4 Photosynthesis». *Plant Physiology* 125, 46-49.

FISHER, D.G., y EVERT, R.F., 1982. «Studies on the Leaf of Amaranthus retroflexus (Amaranthaceae): Morphology y Anatomy». *American Journal of Botany* 69, 1133-1147.

GURALNICK, L.J. y JACKSON, M.D., 2001. «The Occurrence y Phylogenetics of Crassulacean Acid Metabolism in the Portulacaceae». *International Journal of Plant Sciences* 162, 257-262.

GUTIÉRREZ, M.; GRACEN, V.E. y ADWAREDS, G.E., 1974. «Biochemical y cytological relationships in C_4 Plants». *Planta* 119, 279-300.

HONG, J.; JIANG, D.A.; WENG, X.Y.; WANG, W.B. y HU, D.W., 2005. «Leaf anatomy, chloroplast ultrastructure, y cellular localisation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCO) y RuBPCO activase in Amaranthus tricolor L.». *Photosynthetica* 43, 519-528.

JACOBS, S.W.L., 2001. «Leaf anatomy y ultrastructure in the Chenopodiaceae (Caryophyllales)». *J. Torrey Bot. Soc.* 128, 236-253.

LAWTON, J.R., 1988. «Ultrastructure of Chloroplast membranes in leaves of maize y ryegrass as revealed by selective staining methods». *New phytol.* 108, 277-283.

NELSON, E.A.; SAGE, T.L. y SAGE, R.F., 2005. «Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism». *Functional Plant Biology* 32, 409-419.

OSMOND, C.B., 1974. «Leaf anatomy of Australian saltbushes in relation to photosynthetic pathways». *Australian Journal of Botany* 22, 39-44.

PFÜNDEL, E. y NEUBOHN, B. 1999. «Assessing photosystem I y II distribution in leaves from C4 plants using confocal laser scanning microscopy». *Plant, Cell y Environment* 22, 1569-1577.

VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; ARTYUSHEVA, E.G.; FREITAG, H. y EDWARDS, G.E., 2002. «Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in Bienertia cycloptera (Chenopodiaceae)». *The Plant Journal* 31, 649-662.

VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; PYANKOV, V.I. y EDWARDS, G.E., 1999. «Anatomy, chloroplast structure y compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves y cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae)». *Journal of Experimental Botany* 50, 1779-1795.

WATSON, L., y DALLWITZ, M.J., 1992 onwards. «The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, y information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world y local distribution, y references». Version: 6th October 2005. http://delta-intkey.com'.

ZOBEL, A.M. y MARCH, R.E., 1993. «Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruits of some umbelliferae y leguminosae». *Annals of Botany* 71, 251-255.