

José Luis González Rebollar  
Ana Chueca Sancho  
(eds.)

# C<sub>4</sub> y CAM

Características generales y uso en programas  
de desarrollo de tierras áridas y semiáridas



Homenaje al doctor Julio López Gorgé

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS





# **C<sub>4</sub> y CAM**

**Características generales y uso en programas  
de desarrollo de tierras áridas y semiáridas**



# **C<sub>4</sub> y CAM**

**Características generales y uso en programas  
de desarrollo de tierras áridas y semiáridas**

**Homenaje al doctor Julio López Gorgé**

JOSÉ LUIS GONZÁLEZ REBOLLAR  
ANA CHUECA SANCHO  
(eds.)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
FUNDACIÓN RAMÓN ARECES  
Madrid, 2010

Reservados todos los derechos por la legislación en materia de Propiedad Intelectual. Ni la totalidad ni parte de este libro, incluido el diseño de la cubierta, puede reproducirse, almacenarse o transmitirse en manera alguna por medio ya sea electrónico, químico, óptico, informático, de grabación o de fotocopia, sin permiso previo por escrito de la editorial.

Las noticias, los asertos y las opiniones contenidos en esta obra son de la exclusiva responsabilidad del autor o autores. La editorial, por su parte, sólo se hace responsable del interés científico de sus publicaciones.

*Catálogo general de publicaciones oficiales:*  
*<http://publicaciones.060.es>*



© CSIC  
© Fundación Ramón Areces  
© José Luis González Rebollar y Ana Chueca Sancho (eds.), y de cada texto, su autor

NIPO: 472-10-209-7  
ISBN: 978-84-00-09213-9  
Depósito Legal: M. 46.293-2010  
Impreso en Taravilla, S.L.  
Impreso en España. *Printed in Spain*

En esta edición se ha utilizado papel ecológico sometido a un proceso de blanqueado ECF, cuya fibra procede de bosques gestionados de forma sostenible.

Quien desee respuestas nítidas, definitivas y globales a los problemas de la vida, tendrá que ir a buscarlas en alguna otra parte, no en la naturaleza.

S. JAY GOULD

*Desde Darwin: reflexiones sobre Historia Natural*, 1983



# In Memóriam

*Dormiró sol nel manto mio regale  
quando la mia giornata è giunta a sera.*

*Don Carlos (Verdi)*



El 7 de junio del año 2004 falleció en Granada el doctor **Julio López Gorgé**. Cuantos tuvimos la suerte de conocerle y de trabajar con él permanecemos todavía aturridos por su muerte, tan inesperada.

El proyecto en el que se enmarca este libro responde a una idea suya: él fue quien imaginó el trabajo que abordamos, y quien nos convenció para integrar un equipo capaz de hacerlo.

La fotografía al lado de estas líneas es bien elocuente de su entusiasmo; en ella, frente a la potente muralla andina del Aconcagua, el doctor **López Gorgé** presta su estatura científica y humana al ejemplar de *Atriplex lampa* (Guill. et. Mog) que aparece a su lado. Hasta aquellas lejanas tierras nos llevó su determinación. Allí, junto con investigadores de varias universidades y centros de investigación de Argentina y Chile, que participan en esta obra, orientó los primeros pasos del proyecto. Todos los que allí estuvimos conservamos en

nuestra retina la imagen de estos tres grandes protagonistas: la grandiosidad de los espacios naturales andinos, el papel de estas modestas y resistentes plantas  $C_4$  y CAM, y el ejemplo personal y profesional de quien supo interesarnos en su estudio.

Abrir nuevos caminos, orientar al que se inicia en este solitario oficio, sopesar las dimensiones de las dudas, advertir sobre lo que se sabe y sobre lo que se ignora, valorar hacia dónde ir y de dónde volver, aunar el entusiasmo con el escepticismo, y medir el alcance de los falsos sueños, son gran parte del utillaje de un científico. El doctor **López Gorgé**, nos dejó en ello el testimonio de su ejemplo. Continuar sin él ha sido lo más arduo, pues a nosotros tocó saber qué hacer: seguir el camino y hacerlo bien.



LOS EDITORES  
Granada, 6 de junio de 2008



# Índice

<i>Prólogo.</i> Federico Mayor Zaragoza .....	13
<i>A Personal perspective.</i> Bob. B. Buchanan .....	15
<i>Introducción.</i> Editores .....	17
<i>Evolución del metabolismo fotosintético <math>C_4</math> y los estados de transición <math>C_3</math> y <math>C_4</math>.</i> Eduardo A. Pagano, Ricardo A. Wolosiuk y Ana Chueca Sancho .....	19
<i>Las especies <math>C_4</math> y el estrés ambiental.</i> Fernando E. Prado, Mariana Rosa y Mirna Hilal .....	31
<i>Transiciones metabólicas en la fijación fotosintética del carbono en plantas del género <i>Portulaca</i>.</i> María Valeria Lara, María Fabiana Drincovich y Carlos Santiago Andreo .....	43
<i>Bioteología de las plantas <math>C_4</math> y expresión de sus genes.</i> Mariam Sahrawy Barragán, Antonio Jesús Serrato Recio, Juan de Dios Barajas López .....	57
<i>Plantas autóctonas <math>C_4</math> y CAM del mediterráneo español: identificación y análisis.</i> Manuel Santana, Antonio Jesús Serrato Recio, A. Juan Sánchez-Raya, José Ángel Traverso, Eduardo Pagano y Ana Chueca Sancho .....	73
<i>La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC): enzima clave de los metabolismos fotosintéticos <math>C_4</math> y CAM.</i> Cristina Echevarría, José Antonio Monreal, Ana Belén Fera, Eduardo Jiménez, Arancha León, Rosario Álvarez, y Sofía García-Mauriño .....	85
<i>Interaction of thioredoxins h with maize endosperm protein fractions.</i> Abderrakib Zahid y Roland Cazalis .....	99
<i>Identificación histológica y ultraestructural de plantas <math>C_4</math> y CAM.</i> Adela Olmedilla Arnal, Juan de Dios Alché Ramírez y María Isabel Rodríguez-García .....	107
<i>Análisis estructural del aparato fotosintético en plantas <math>C_4</math> y CAM mediante microscopía de fluorescencia/confocal.</i> Juan de Dios Alché Ramírez, Adela Olmedilla Arnal y María Isabel Rodríguez García .....	115
<i>El suelo, regulador fisicoquímico de elementos traza para las plantas.</i> María Dolores Mingorance Álvarez .....	129
<i>El recurso suelo-agua en medios áridos y semiáridos.</i> Jesús Fernández Gálvez .....	143
<i>Sodio en plantas <math>C_4</math>.</i> Olga Lastra Cabezas .....	151
<i>Influencia de la salinidad en la germinación de especies del género <i>Atriplex</i>.</i> Ana B. Robles Cruz, Juan A. Cardoso y María Eugenia Ramos Font .....	157
<i>Plantas <math>C_3</math>, <math>C_4</math> y CAM nativas del monte árido argentino, adaptaciones y potencial biológico.</i> Carlos Passera, Bruno Cavagnaro y Carmen Sartor .....	165
<i>Establecimiento y desarrollo de <i>Atriplex halimus</i> L.: técnicas de implantación y efecto del pastoreo.</i> Jabier Ruiz Mirazo y Ana B. Robles Cruz .....	177
<i>Epílogo.</i> José Luis González Rebolgar .....	191
<i>Directorio</i> .....	193



# Prólogo

... en este ahora que se duele y habla,  
sobrepasando la luz a todo ensueño...

MARÍA NOVO

Granada. Instituto López-Neyra, Zaidín, CSIC. 1963. Mis primeros recuerdos de Julio López Gorgé, constante en su trabajo, en la verificación de sus hipótesis. Fue siempre un ejemplo de coherencia y rigor, no sólo por las preguntas que formulaba sino por la forma en que concebía darles respuesta. Era un «razonador» impecable. Implacable. Uno de los hombres más «educados» que he conocido, en el sentido de que elaboraba sus propias respuestas y actuaba según sus propias reflexiones.

Su fallecimiento, tan prematuro, tan madrugador, representa una pérdida muy importante para la comunidad científica e intelectual. Tenía la misma actitud de búsqueda en múltiples campos, que sus ojos escudriñaban sin cesar. Como su mente. Melómano, emplazado en la misma frontera del arte. Y de la poesía, que con tanto acierto practicaba su hermano.

Profesor de investigación realizó, junto con un grupo de colaboradores y discípulos y, en primer término, de su mujer Ana Chueca, excelentes aportaciones especialmente en el campo de la fisiología vegetal. La Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular le rindió, a través de la pluma de Juan Pedro Donaire, un sentidísimo homenaje en el boletín del mes de diciembre de 2006, en el que describe la importancia de sus trabajos sobre la regulación de la actividad fotosintética.

Nuestra colaboración viene de lejos. En la I Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica, en 1964, presentamos —Julio, Miguel Monteoliva y yo— un trabajo sobre «Descarboxilasas de aminoácidos en parásitos intestinales» como fruto de la colaboración entre el Instituto López-Neyra de Parasitología y la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Granada. Poco después aparecía publicado en *Nature* (205/4976, 1111-1113, 13 de marzo 1965) el trabajo *L-Glutamate-1-Carboxylyase in Intestinal Parasites*, en el

que Francisco Sánchez Rasero se añadía a los tres firmantes mencionados. En 1968, en *Experimental Parasitology*, se publica el trabajo *L-Lysine Carboxylyase in Ascaris Lumbricoides and Monezia expansa*.

En 1970 me envía el siguiente escrito: «En la última Junta de Gobierno de la Estación, don Luis (Recalde) me dio, para que lo pasara a usted, el adjunto proyecto de Convenio referente a la Escuela de Nutrición. Quiere saber su opinión... Siento no poder verle hoy —tengo algunos asuntos que comentarle— pero es que nuestro crío no nos deja en paz...». Los niños son los primeros, normalmente, en hacernos ver la importancia del sosiego y del silencio...

Tengo una nota de 20 de septiembre de 1972 en la que se dice: «Hablo con Julio López Gorgé para establecer las previsiones de gastos extraordinarios de la sección de Bioquímica de la Estación Experimental de Zaidín para el curso 1972-73. Julio me dice que si puede adquirir el aparato de gel de poliacrilamida, que actualmente tienen a prueba, sería suficiente»... En esta época publicamos, con Luis Alfonso del Río y José Olivares, el trabajo titulado *Aislamiento y purificación de antibióticos del Pseudomonas reptilivora*.

En febrero de 1974, Julio me escribe: «Con fecha de hoy envío a Goodwin del Editorial Board de *Phytochemistry* el manuscrito del trabajo *Fructose-1,6-di Phosphatase from Spinach Leaves Chloroplasts*... Me ha gustado mucho como ha quedado el trabajo... Seguimos trabajando sobre esta enzima y hemos avanzado ya mucho en el terreno estructural así como en sus características físico-químicas y cinéticas... Juanjo (J. J. Lázaro, que con Ana Chueca firmaron también el trabajo) ha empezado ya a escribir la tesis»...

Seguimos escribiéndonos regularmente en 1974 y en 1975, época en que concluyó mi «tutela» académica, al tiempo que se incrementaba su reconocimiento

como excelente científico que ya podía volar —y hacerlo muy bien— con alas propias.

Conservo cartas de Ana Chueca, más «escribidora» que Julio, como la fechada en 1986 en Coventry: habla de las investigaciones que están realizando, del fallecimiento de su padre, amplía información sobre sus hijos... «Nos enteramos que a Federico le han propuesto para Director General de la UNESCO... Creemos que es un puesto muy interesante... y nos alegraría muchísimo».

En el presente libro-homenaje, tan bien coordinado por el profesor José Luis González Rebollar, se describen, por sus colaboradores, los pasos dados en los aspectos fisiológicos, bioquímicos, histológicos, botánicos y ecológicos de las plantas  $C_4$  y CAM pero, sobre todo, los trazos más relevantes de su semblanza humana. «En mis casi 40 años de experiencia profesional —escribe el profesor González Rebollar— he conocido muy pocos casos de investigadores capaces de trascender la estricta parcela científica que les identifica».

Ana Chueca y Julio López Gorgé, «ensimismados», que diría Antonio Gala, sembradores en muchos surcos para recolectar después los frutos de su dedicación científica y artística. Amaba el lenguaje musical sinfónico y lírico. La ópera le apasionaba y era capaz de sumergirse en las profundidades de este arte polimórfico. Importante botón de muestra: *Don Carlos*, un drama musical entre la historia y la leyenda. El tema del «Lacrymosa» en el *Don Carlos* de Verdi constituye un estudio de hondo calado, culminado, con su hija Amalia, en el año 2003, unos meses antes de su muerte. Me había entregado un texto preliminar el día 14 de mayo de 2002. «El científico —escribe Julio en la “Justificación” de este ensayo— debe estar comprometido con el mundo del humanismo en cualquiera de sus facetas...»

«Este trabajo —doy la palabra a sus autores— contempla aspectos históricos y leyendas que surgieron alrededor de la corta pero accidentada vida del desdichado Don Carlos, que en cierta medida marcaron el reinado de su padre Felipe II. Asimismo, se hace un

recorrido sobre la abundante literatura a que dieron lugar estos hechos y su impacto en la producción operística posterior». La semblanza de Giuseppe Verdi, su apasionamiento por el drama de Friedrich Von Schiller *Don Carlos, Infante de España* en un momento histórico en que el genial compositor sentía la necesidad, frente al movimiento de la «Scapigliatura», de conseguir una obra que se situara, por su grandeza y calidad, por encima de toda controversia mediante la «fuerza y osadía» preconizadas por el fulgurante antecedente del joven Werther, de Goethe.

El arte como gran impulsor de los ideales, de la libertad de expresión, de la vida en plenitud. Al análisis histórico se une el musicológico, incluyendo los cambios puntuales en el texto para evitar la censura. La danza en la ópera de Verdi es también motivo de estudio, especialmente el que se refiere en el acto III de *Don Carlos* a la leyenda de la perla «La peregrina».

Creo que sería muy conveniente publicar este libro. Sería una iniciativa a la que me asociaría gustoso para hacerla realidad.

El 7 de junio del año 2004 Julio López Gorgé falleció «como el rayo». A Ana y sus hijos Ignacio y Amalia, a sus familiares, a sus amigos, a sus discípulos y colaboradores, el recuerdo y la amistad permanentes, que permiten saberle y sentirle a nuestro lado aunque ya no podamos verle. Cada vez más, los invisibles se convierten en compañeros inseparables. En luminosos puntos de referencia, como las estrellas ya extinguidas.

Julio López Gorgé, amigo y compañero tan abruptamente separado físicamente de nosotros, este libro refleja, escrito con gran cariño, algunos trazos de una vida densa y tensa. Pero se llevó el secreto —que sólo conoce seguramente Ana— de su indomable temperamento, de su proceder perentorio, urgido, apremiante. La paz para él era todo menos descanso. Era acción. Era compromiso con los más jóvenes. Le imagino muy ocupado en los espacios que habita, como lo está en la imagen que de él guardamos. Y desgranamos.

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

# A Personal Perspective

BOB B. BUCHANAN  
Berkeley, California

It is an honor, indeed, to pay tribute to the memory of Julio López-Gorgé, an imaginative plant biochemist and proud son of Spain. Julio's contributions to science have recently been elegantly summarized<sup>1</sup>. In this brief account, I describe the key role he played in fostering new research fields.

I first met Julio in 1981—the year Pierre Gadal and I organized the inaugural International Conference on Thioredoxins in Berkeley. Accompanied by his charming wife, Ana Chueca, Julio gave a poster presentation on chloroplast fructose biphosphatase (FBPase) at the conference<sup>2</sup>. With this, he made the first of many contributions to an area that was a fledgling at the outset, but with time developed into a vibrant field that today embraces all of biology. As the sole representatives of Spain at the Berkeley meeting, Julio and Ana helped launch this new field, now known as redox biology, on the Iberian Peninsula. Today a number of laboratories in the region focus on different aspects of redox biology. While he was engaged with the chloroplast work, I met Julio on several occasions. On two of these, he served as a gracious host in Granada, once for our whole family. In addition, Angel de la Torre, a member of the Granada group, spent a productive visit as postdoctoral scholar in our laboratory in the early 1980s.

After the Berkeley conference, Julio led a project in which he gave new insight into the properties of

chloroplast FBPase with respect both to its interaction with *f*-type thioredoxin and its light-induced biosynthesis. This work prompted him to apply tools of molecular biology to study the problem. Again, his experiments contributed to our bank of knowledge of these two proteins that are considered fundamental to photosynthetic carbon dioxide assimilation in chloroplasts. Julio's work also provided some of the first evidence that thioredoxins function in oxidative stress responses in plants. Julio's young Granada colleagues have extended his work in efforts to improve the nutritional properties of foods.

The success in applying molecular biology both to chloroplasts and foods provided the background for the next chapter in Julio's career. He was aware of the growing shortage of water in regions such as southeastern Spain. In consultation with others, he proposed the introduction of  $C_4$  and Crassulacean acid metabolism (CAM) plants into the region. These species, that are the subject of this book, survive and, in some cases, thrive under arid conditions unable to support propagation of  $C_3$  counterparts. Julio foresaw that land currently left fallow could be developed to cultivate crops such as sorghum to be used not only for food, but also for fuel. In this way the productivity of Spain could be invigorated and reach unforeseen highs. As with his entry in redox biology, Julio was able to the look into the future and apply his talents to improve it. He was a Renaissance person not only in science but in music and the arts as well. I feel fortunate to have known him.

March 10, 2007

<sup>1</sup> Photosyn. Res. 2005 83: 283-286.

<sup>2</sup> Pla, A and López-Gorgé, J. 1981 Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin-thioredoxin system. *International Conference on Thioredoxins*, University of California at Berkeley, USA, June 21-24, 1981.



# Introducción

Nuestros extensos y documentados herbarios, las constantes aportaciones a los catálogos florísticos de las zonas más diversas del mundo, y los cada vez mejor editados documentos sobre la vegetación, la flora y los recursos del planeta, apoyados con frecuencia en detalladas cartografías, nos proporcionan una equívoca percepción sobre lo que verdaderamente conocemos de nuestras plantas. Tampoco en los aspectos celulares, fisiológicos, bioquímicos, o genéticos, se ha ido mucho más allá de un escaso grupo de especies, comunes en todas las bibliografías del mundo. Y no digamos nada al respecto, sobre la vertiente más utilitarista de nuestros recursos botánicos, como proveedores de alimentos, aplicaciones técnicas, usos industriales, valor medicinal, etc., que apenas reúne una muestra relevante de especies y variedades. No es, por tanto, un rasgo de modestia proclamar que seguimos sin conocer gran parte de la flora del planeta: el significado ecológico de muchas de sus especies, sus posibilidades de uso, y el patrimonio genético que atesora.

En relación con este «estado del arte», la obra que aquí recogemos es el fruto de un proyecto de investigación, financiado en convocatoria pública por la Fundación Ramón Areces, que orientó sus objetivos a documentar uno de los conjuntos más interesantes de nuestra flora: sus especies  $C_4$  y CAM. Especies interesantes por sus características fisiológicas y condiciones en las que viven (áreas de alta radiación, alta oscilación térmica día-noche y alta xericidad), pero también por su potencialidad técnica en la mejora de las condiciones agrarias, forestales, pascícolas y medioambientales de ambientes fuertemente sometidos a estrés hídrico.

El concepto  $C_4$  deriva de un proceso fotosintético particular, en el que los primeros productos de la asimilación del  $CO_2$  son compuestos carbonados de cuatro átomos de carbono (malato y oxalacetato, fundamentalmente), frente a los de tres átomos de las

especies  $C_3$ . Todo ello consecuencia de una forma particular de captación primaria del  $CO_2$  atmosférico que tienen las  $C_4$ , merced a una enzima, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, distinta de la usada por las  $C_3$  (Rubisco); y también a una anatomía singular de las hojas (anatomía Kranz), derivada de la coexistencia en ellas de dos tipos de cloroplastos (mesofílicos y del parénquima vascular), frente al tipo único que presentan las  $C_3$  (del tejido mesofílico en empalizada).

Este metabolismo y estructura constituyen adaptaciones dirigidas a establecer mecanismos de concentración del  $CO_2$  atmosférico y a minimizar las pérdidas de agua por transpiración. Exhiben menor consumo y mejor aprovechamiento del nitrógeno, derivado de sus menores necesidades en Rubisco, enzima responsable de la captación primaria del carbono en las especies  $C_3$ . Como consecuencia de ello estas especies pueden superar determinadas condiciones adversas, colonizando hábitat en los que las  $C_3$  tendrían menos viabilidad. Una particularidad de las  $C_4$  es su elevada tasa de fotosíntesis neta, lo que se traduce en una mayor capacidad asimilatoria por unidad de superficie foliar y, en última instancia, mayor cantidad de materia orgánica por unidad superficial de terreno.

En todo caso, el síndrome  $C_4$  no está vinculado a grupos taxonómicos determinados, existiendo especies con estas características en grupos muy diferentes, a la vez que es frecuente encontrar plantas  $C_4$  compartiendo el mismo género con otras, que son  $C_3$  (o intermedias). Varias y conocidas  $C_4$  constituyen cultivos de gran importancia económica o son interesantes recursos pascícolas para la ganadería de zonas áridas y semiáridas. Adicionalmente, su alta eficacia a la hora de instalarse en suelos sometidos a condiciones de fuerte radiación, alta oscilación térmica y extrema xericidad las hace muy interesantes como posibles auxiliares en la protección de tierras y taludes erosivos, programas de

revalorización agraria, y planes de lucha contra la desertificación, en los que la instalación de una primera cubierta vegetal, protectora, es altamente exigente en el empleo del recurso agua.

En una línea emprendida por otros países, bajo el denominador común de hacerlo en agrosistemas y espacios fuertemente afectados por condiciones de aridez, las aportaciones recogidas en esta obra responden a nuestro interés por reunir en ella un conjunto de experiencias interdisciplinares sobre nuestras plantas  $C_4$  y CAM; en definitiva, fortalecer nuestra capacidad de acción y nuestro conocimiento sobre recursos que están en nuestro entorno natural inmediato, reivindicando para ello un papel transferible que va más allá de los catálogos descriptivos al uso.

El agua es el bien más escaso en estas zonas xéricas del mundo y las acciones que se emprenden contando con su plena disposición (control de taludes en carreteras, rehabilitación de explotaciones mineras, mejoras de pastos, frenos a la erosión, repoblación forestal de tierras en abandono, etc.) o fracasan tras las fases de instalación, o permanecen largo tiempo ligadas al apoyo de riegos. Riegos que, no sólo son caros y por tanto requieren una inversión económica adicional, sino que fuerzan la explotación de recursos no siempre renovables, o falsean las condiciones ecológicas del entorno que se pretende revalorizar (haciéndolo, con elementos extraños al mismo). En definitiva, prácticas que, cuando no están en oposición con la xericidad del medio, lo están con las posibilidades de uso sostenible del territorio, o con gran parte de los objetivos de conservación del paisaje y de sus recursos naturales.

En ambientes críticos, el recurso botánico más eficiente es siempre el que ya está en la zona. Es el mejor adaptado al ambiente y a su larga historia de ocupación humana. Pero incluso cuando existieran dudas al respecto, cuando ante circunstancias excepcionales la prudencia recomendara revisar aquel principio, siempre deberíamos interpelarnos sobre la verdadera ayuda que, en ocasiones, nos han prestado muchos elementos exógenos de aparente interés. Abundan los ejemplos de recursos, métodos y planteamientos que, siendo eficientes en otras partes del mundo, han causado más problemas de los que venían a resolver. La incorporación de las plantas  $C_4$  de nuestro entorno a muchas actuaciones

técnicas de rehabilitación y puesta en valor de las tierras más xéricas responden bien a los cambios conceptuales que se propugnan sobre el empleo del agua: el agua que mejor se usa es aquella que se ahorra.

Esta obra se estructura alrededor a un equipo de investigadores especializados en biología vegetal, fisiología, bioquímica, edafología, botánica y ecología forestal. La mayor parte han sido integrantes del proyecto *Aplicación de especies autóctonas  $C_4$  y CAM en programas de revalorización y desarrollo de zonas áridas y semiáridas del mediterráneo español*, financiado por la Fundación Ramón Areces. No obstante, el propósito emocional de la misma es rendir homenaje a quien nos convocó alrededor de la idea: el doctor Julio López Gorgé. Tras su fallecimiento decidimos dejar recogido en un documento el estado alcanzado por los estudios y las propuestas que debían quedar abiertas. Sabedores de ello, otros colegas han deseado unirse al homenaje, y al testimonio de admiración y aprecio que persigue.

Los doctores Federico Mayor Zaragoza y Bob B. Buchanan abren las páginas de este libro, dedicado a Julio López Gorgé. El prestigio de los tres habla bien del compromiso científico que enmarca sus vidas. Pero, como acertadamente señala Ana Chueca, lo que deseamos destacar aquí es esa inestimable condición de hombres renacentistas, en la ciencia y en las artes, que siempre les ha diferenciado.

La obra reúne un conjunto de estudios sobre biología, fisiología, bioquímica, histología y biotecnología de plantas  $C_4$  y CAM del mediterráneo español y de las tierras áridas de Chile y Argentina. Le siguen varias investigaciones sobre el recurso agua, la regulación fisicoquímica del suelo y la influencia de la salinidad; y la cierran sendos estudios sobre adaptaciones y potencial biológico de plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM, y experiencias de establecimiento en campo. Muchas de las líneas de investigación que respaldan estos textos continúan aportando hoy nuevos conocimientos sobre estos recursos, y sobre el interés de su incorporación a programas de puesta en valor de las tierras más fuertemente afectadas por el abandono rural. En la parte final del libro, el lector encontrará una relación pormenorizada de los autores.

LOS EDITORES

# Evolución del metabolismo fotosintético $C_4$ y los estados de transición $C_3$ - $C_4$

EDUARDO A. PAGANO\*  
RICARDO A. WOLOSUK\*\*  
y ANA CHUECA SANCHO\*\*\*

## Resumen

La fotosíntesis  $C_4$  evolucionó en diferentes familias de plantas superiores a partir de 45 núcleos independientes. Está ampliamente aceptado que este proceso surgió en ancestros  $C_3$  que adquirieron ventajas adaptativas ante los cambios globales del ambiente, principalmente la disminución del  $CO_2$  atmosférico. Sobre estas bases, las especies cuyo metabolismo presenta características intermedias entre  $C_3$  y  $C_4$  constituyen una herramienta adecuada para establecer los cambios anatómicos y fisiológicos que condujeron a la fotosíntesis  $C_4$ . La presente revisión examina los rasgos estructurales, ecológicos y metabólicos de las plantas  $C_3$ - $C_4$  típicas y los estados de transición para dilucidar el rol que habrían jugado en la evolución hacia la fotosíntesis  $C_4$ .

## Summary

The  $C_4$  photosynthetic pathway evolved in different families of higher plants starting from 45 independent nuclei. It is widely accepted that this process arose from  $C_3$  ancestors that acquired advantages in response to global environmental changes, mainly the decrease of the atmospheric  $CO_2$ . On this basis, species whose metabolism shows intermediate features between  $C_3$  and  $C_4$  constitute an adequate tool to unveil the anatomical and physiological changes that led to  $C_4$  photosynthesis. The present review examines structural, ecological and metabolic features of typical  $C_3$ - $C_4$  plants and transition states in order to elucidate the role that would play in the evolution towards  $C_4$  photosynthesis.

## Introducción

La capacidad de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) para catalizar la oxigenación (ribulosa-1,5-bisfosfato +  $O_2 \rightarrow$  3-fosfoglicato + 2-fosfoglicolato) de la ribulosa-1,5-bisfosfato simultáneamente con la carboxilación (ribulosa-1,5-bisfosfato +  $CO_2 \rightarrow$  2, 3-fosfoglicerato) promueve el funcionamiento del ciclo fotorrespiratorio. Como la liberación del  $CO_2$  en este proceso es un efecto diametralmente opuesto a la fotosíntesis, una serie de mecanismos evitan la transferencia del  $CO_2$  a la atmósfera y aumentan su concentración en las cercanías del centro activo de la RUBISCO. Situadas en las membranas plasmáticas de algunos organismos acuáticos (cianobacterias, algas, plantas), ciertas bombas contribuyen a la captación del  $CO_2$  e impiden su liberación. En cambio, dos caminos metabólicos, encontrados mayoritariamente en las plantas terrestres, suplementan el ciclo de Benson-Calvin; el metabolismo CAM, típico de los ambientes desérticos y la fotosíntesis  $C_4$ , encontrada frecuentemente en ambientes tropicales.

La adquisición de ventajas adaptativas por ancestros  $C_3$  (ciclo de Benson-Calvin) para tolerar condiciones extremas del ambiente devino en la aparición de las plantas  $C_4$ . En épocas pretéritas, el descenso del  $CO_2$  atmosférico, las elevadas temperaturas y el déficit hídrico favorecieron la aparición y la expansión de las plantas  $C_4$ . Actualmente, el aumento de la temperatura y la falta de agua previstos por el cambio global promoverían el crecimiento de las plantas  $C_4$  respecto a las plantas  $C_3$ , pero el aumento de los niveles atmosféricos del  $CO_2$  actuaría en sentido inverso. Tal vez estas condiciones ambientales den ventajas adaptativas a especies que no responderán estrictamente a las características de las  $C_3$  —favorecidas por el aumento del  $CO_2$  pero no por las altas temperaturas ni la aridez— o de las  $C_4$  —hábiles a la tolerancia térmica y en el uso del agua pero poco eficientes a elevadas concentraciones de  $CO_2$ —.

La fotosíntesis  $C_4$  está presente en 7500 especies de plantas con flores, (3% de las 250.000 especies de plantas terrestres) constituídas por gramíneas (4500

\* Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, 1417-Buenos Aires, Argentina.

\*\* Instituto Leloir, Av. Patricias Argentinas 435, 1405 - Buenos Aires, Argentina.

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

especies), juncos (1500 especies) y dicotiledóneas (1200 especies) (Sage, 2004). Las variaciones en esta capacidad fotosintética no sólo reconocen 45 orígenes independientes provenientes de 19 familias de plantas superiores sino también presentan estados intermedios entre el metabolismo  $C_3$  y el  $C_4$ . En las últimas tres décadas numerosos estudios analizaron los estados de transición  $C_3$ - $C_4$  para comprender el proceso evolutivo y con ello obtener la información que haga plausible utilizar estas especies en el diseño de programas de conservación y recuperación de tierras. Esta revisión analiza, primero, el rol que los estados de transición  $C_3$ - $C_4$  juegan en la evolución de la fotosíntesis  $C_4$  sobre la tierra y, luego, los avances recientes en el conocimiento de las especies representativas.

## Evolución del metabolismo $C_4$

Aunque la presencia de la anatomía Kranz en los restos fósiles permite rastrear el origen de las plantas  $C_4$ , el análisis bioquímico de las especies actuales aporta información valiosa. La discriminación isotópica constituye un procedimiento adecuado para estos estudios por cuanto RUBISCO favorece la asimilación de la forma más abundante ( $^{12}\text{C}$ ) en contra del isótopo pesado ( $^{13}\text{C}$ ) mientras que la captación de este último prevalece en la fijación por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) ( $\text{PEP} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{oxaloacetato} + \text{Pi}$ ), debido a la formación de  $\text{HCO}_3^-$  en la disolución del  $\text{CO}_2$  atmosférico. La anhidrasa carbónica ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) es también una enzima relevante para la comparación de las plantas  $C_3$  con las  $C_4$ . Múltiples isoformas fueron aisladas de tejidos foliares tanto en plantas  $C_3$  como en plantas  $C_4$ . En plantas  $C_3$ , el estroma de los cloroplastos contiene la mayor parte de la actividad pero su rol fotosintético no está aclarado. En plantas  $C_4$ , en cambio, la concentración de la anhidrasa carbónica en el citosol de las células del mesófilo sugiere que su actividad es esencial para desencadenar la vía  $C_4$ . Para probar esta hipótesis Von Caemmerer *et al.* (2004) utilizaron una línea de *Flaveria bidentis* en cuyo genoma introdujeron una secuencia antisentido de la anhidrasa carbónica. El ritmo fotosintético de estas plantas transgénicas ( $C_4$ ) mostró una caída pronunciada que contrastaba con líneas de tabaco ( $C_3$ ) transformadas en forma similar (Price *et al.* 1994) en las cuales la disminución fue menor al 2%.

Hace 2.700 millones de años que la fotosíntesis es responsable de la vida sobre la tierra. El metabolismo  $C_3$  prevaleció en la mayoría de los ecosistemas terrestres hasta la expansión de las plantas  $C_4$  hace 5-8 millones de años (Mioceno tardío) (Osborne y Beerling, 2006). La fotosíntesis  $C_4$  apareció en la biosfera cuando la concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$  disminuyó a niveles que limitaban la fotosíntesis, dominando actualmente las praderas y sabanas tropicales con una elevada contribución (25%) a la productividad primaria del planeta (Osborne y Beerling, 2006). Este mecanismo adaptativo opera como una bomba encargada de aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  en la proximidad del centro activo de RUBISCO para favorecer la actividad carboxilasa. Aunque en la mayoría de las plantas  $C_4$  la fotosíntesis se produce por la acción concertada de las células del mesófilo y las células de la vaina vascular, el dimorfismo celular no es una condición indispensable. Evidencias aportadas por Voznesenskaya *et al.*, (2001a) revelaron el funcionamiento de la fotosíntesis  $C_4$  en una misma célula de *Borszczowia aralocaspica*, especie de la familia *Chenopodiaceae* que crece en las salinas deprimidas de los semidesiertos de Asia central.

Resulta sorprendente que el ritmo de aparición de las especies  $C_4$  coincida cronológicamente con lugares tan distantes como el este de África, Pakistán y Norteamérica (Osborne y Beerling, 2006). Esta expansión casi sincronizada en la biosfera es congruente con la teoría de un disparador mundial como lo fue la declinación del contenido de  $\text{CO}_2$  atmosférico (Ehleringer *et al.*, 1991; Cerling *et al.*, 1997). Aunque la fotosíntesis  $C_4$  apareció inicialmente en las monocotiledóneas 24-35 millones de años atrás, las primeras dicotiledóneas con metabolismo  $C_4$ , pertenecientes a la familia *Chenopodiaceae*, surgieron 15-21 millones de años atrás. La fotosíntesis  $C_4$  predomina actualmente en tres familias de monocotiledóneas —Poaceae, Cyperaceae e Hydrocharitaceae— y en 16 familias de dicotiledóneas (considerando *Amaranteaceae* y *Chenopodiaceae* como familias independientes). El análisis filogenético revela que estas familias provienen de diferentes ancestros  $C_3$  sugiriendo que las especies  $C_4$  evolucionaron en forma independiente de distintos núcleos (Sage, 2004). Las variaciones en las características metabólicas pueden atribuirse a 45 orígenes independientes provenientes de 19 familias de plantas superiores, siendo uno de los ejemplos más asombrosos de evolución convergente en las plantas. Estudios recientes incorporan a este modelo reversiones de la fotosíntesis  $C_4$  hacia la  $C_3$ , identifica-

das durante la evolución de linajes que incluyen a la especie intermedia *Steinchisma bians* (*Poaceae*) (Duvall *et al.*, 2003).

### Transición $C_3$ - $C_4$ en la evolución de la fotosíntesis $C_4$

El punto de compensación es la concentración de  $CO_2$  en la atmósfera de una cámara cerrada cuando la fijación de  $CO_2$  por fotosíntesis iguala a su liberación por fotorrespiración y respiración mitocondrial. Aunque los valores de las plantas  $C_4$  (0-0,5 kPa  $CO_2$ ) son generalmente menores que las contrapartes  $C_3$  (4-5,5 kPa  $CO_2$ ), numerosas especies presentan valores intermedios. A la primera identificada, *Mollugo verticillata* (Kennedy y Laetsch, 1974; Rawsthorne, 1992), siguieron más de 20 especies agrupadas en 10 géneros (cuatro de monocotiledóneas y seis de dicotiledóneas) (McKown *et al.*, 2005). En los últimos años los estudios de las especies  $C_3$ - $C_4$  permitieron caracterizar las fases importantes en la evolución de las plantas  $C_4$ , y condujeron a numerosos modelos sobre la secuencia de eventos en la transformación. A partir de los modelos sobre el proceso evolutivo de las plantas  $C_4$ , Sage (2004) propuso *siete fases* distintivas en las cuales la inclusión de especies actuales en alguna de ellas indicaría una evolución no completada. Según este autor la *primera fase* produjo el acondicionamiento general de los genotipos para originar los focos de evolución casi simultáneamente en todo el globo. El múltiple origen de la vía  $C_4$  en algunas familias de angiospermas sugiere que ciertas especies desarrollaron características que las tornaron predisuestas para evolucionar hacia el metabolismo  $C_4$ . Dentro de los múltiples rasgos para esta predisposición sobresale la creación y el mantenimiento de un gran número de genes duplicados que permitió la aparición de mutaciones sin afectar la funcionalidad de la planta pero suministrando ventajas adaptativas (Monson, 2003). La *segunda fase* desarrolló una disposición anatómica tendiente a disminuir la distancia entre las células del mesófilo y las de la vaina celular facilitando en consecuencia la difusión rápida de los metabolitos. La mayor presencia del metabolismo  $C_4$  en las gramíneas relativa a las dicotiledóneas sugiere que esta distancia en las plantas con los elementos de conducción paralelos sería menor que en las especies con una disposición reticulada. Dado que las células de la vaina vascular en las plantas  $C_3$  presentan pocos

cloroplastos y mitocondrias, la *tercera fase* implicó un aumento de la proporción de las organelas en dicha localización. A este grupo pertenecerían las plantas  $C_3$  que presentan una anatomía tipo Kranz. Una vez que el número de cloroplastos aumentó, el procesamiento de la glicina producida por la fotorrespiración dentro de las células de la vaina constituyó la nueva ventaja adaptativa. Dentro de la *cuarta fase*, la pérdida de la glicina descarboxilasa en el mesófilo impulsó la metabolización del aminoácido con la consecuente liberación del  $CO_2$  en las células de la vaina, como ocurre en la especie *Moricandia arvensis*. La *quinta fase* estuvo caracterizada por mayores niveles de la PEP carboxilasa en el mesófilo incrementando la captación del  $CO_2$  producido por la glicina descarboxilasa en la vaina vascular. Este proceso impide la liberación  $CO_2$  a la atmósfera y, en consecuencia, conduce a la ausencia de una fotorrespiración detectable. El género *Flaveria* constituiría un ejemplo viviente de esta fase porque presenta no sólo tanto plantas  $C_3$  como  $C_4$  típicas sino también numerosos estados intermedios. Congruente con esta característica, la actividad PEP carboxilasa de las plantas  $C_3$  es 40, 20 y 5 veces menor que las especies  $C_4$  típicas, *F. linearis* y *F. brownii* (intermedias  $C_3$  -  $C_4$ ), respectivamente. (Monson y Moore 1989). En este contexto, el requerimiento adicional sería el aumento de las enzimas que reponen el PEP en el metabolismo  $C_4$ . Probablemente, la piruvato diquinasas (Piruvato + ATP + Pi  $\rightarrow$  PEP + AMP + PPI) asumió el papel principal en la regeneración del PEP cuando la PEP carboxilasa predominó en el mesófilo (Monson y Moore, 1989). La integración de los ciclos  $C_3$  y  $C_4$  en la *sexta fase* requirió la expresión coordinada de las enzimas del mesófilo encargadas de (a) fijar el  $CO_2$  (anhidrasa carbónica y PEP carboxilasa), (b) movilizar el carbono fijado y liberarlo en los cloroplastos de las células de la vaina (malato deshidrogenasa y enzima málica) y, (c) regenerar el PEP (piruvato diquinasas) y el ATP (adenilato quinasas). Es destacable que, a diferencia del impreciso papel que llevaría a cabo en plantas  $C_3$ , el aumento de la actividad anhidrasa carbónica en el mesófilo de las plantas  $C_4$  juega un rol importante en la transformación del  $CO_2$  atmosférico en  $HCO_3^-$ , sustrato de la PEP carboxilasa. En línea con el aumento de la expresión de las enzimas de la vía  $C_4$ , la actividad de RUBISCO cayó simultáneamente a niveles despreciables en las células del mesófilo. En la *séptima (última) fase*, el metabolismo  $C_4$  optimizó no sólo las concentraciones de los diferentes metabolitos sino tam-

bién los mecanismos de regulación enzimática, haciendo más eficiente el proceso fotosintético. Ilustrativa en este aspecto es la enzima málica dependiente de NADP (NADP-ME) cuyas isoformas en plantas  $C_4$  poseen mayor actividad específica y menor  $K_m$  que sus ancestros  $C_3$  (Drincovich *et al.* 2001) mientras que la especie intermedia *Flaveria floridana* exhibe valores que se ubican entre las contrapartes de  $C_3$  y  $C_4$  (Casati *et al.*, 1999).

### Aspectos estructurales

El metabolismo  $C_4$  representa un claro ejemplo de compartimentalización en plantas (Hatch, 1987; Lunn, 2007). El esquema clásico implica la fijación inicial del  $CO_2$  en el citosol de las células del mesófilo por el fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción catalizada por la PEP carboxilasa. El oxalacetato, producto de esta reacción, es reducido a malato por la malato deshidrogenasa ( $Oxaloacetato + NADPH + H^+ \rightarrow malato + NADP^+$ ) o bien transaminado a aspartato por la aspartato amino transferasa ( $Oxaloacetato + glutamato \rightarrow aspartato + 2\text{-oxoglutarato}$ ). Estos dos productos de cuatro carbonos, malato y aspartato, son transportados vía plasmodesmos a las células de la vaina vascular para ser transformados en compuestos de tres carbonos por la liberación de  $CO_2$ . En esta etapa, la descarboxilación exhibe no sólo diferentes reacciones sino también diferente localización intracelular. En los cloroplastos de las células de la vaina, la ribulosa-1,5-bisfosfato asimila el  $CO_2$  liberado mediante la acción de RUBISCO y el 3-fosfoglicerato producido procede a compuestos orgánicos vía el ciclo de Benson-Calvin. PEP carboxilasa y RUBISCO están localizadas en las células del mesófilo y de la vaina, respectivamente, mientras que las descarboxilasas residen en diferentes compartimentos intracelulares de las células de la vaina: NADP-ME en los cloroplastos y NAD-ME en las mitocondrias ( $Malato + NAD(P)^+ \rightarrow piruvato + CO_2 + NAD(P)H + H^+$ ) y la PEP carboxiquinasa en el citosol ( $Oxaloacetato + ATP \rightarrow PEP + CO_2 + ADP$ ). Los productos de la descarboxilación (piruvato, alanina, PEP) son transportados a las células del mesófilo para restituir el sustrato de una nueva carboxilación vía la PEP carboxilasa. El dimorfismo celular en las plantas  $C_4$  también causa la partición de los productos de la asimilación fotosintética de  $CO_2$ . La síntesis de sacarosa, lípidos tetrapirroles e isoprenoides está localizada

preferencialmente en las células del mesófilo, al igual que la asimilación del nitrógeno, mientras que la síntesis de almidón y la asimilación del azufre son llevadas a cabo en las células de la vaina vascular (Lunn y Furbank, 1997; Majeran *et al.*, 2005; Lunn, 2007).

Por muchos años la fotosíntesis  $C_4$  estuvo ligada conceptualmente a la anatomía Kranz. Sin embargo, el hallazgo de la especie *Borszczowia aralocaspica* demostró que el metabolismo  $C_4$  no requiere estrictamente el dimorfismo celular. *Chenopodiaceae*, la familia que posee el mayor número de especies  $C_4$  entre las dicotiledóneas, presenta diferentes características, incluyendo cinco variantes de anatomía Kranz y dos de bioquímica  $C_4$  (Voznesenskaya *et al.*, 2001a). La comparación de la anatomía foliar de *B. aralocaspica* con otras dos quenopodiáceas: —*Salsola laricina* y *Suaeda heterophylla*— reveló notables diferencias. *S. laricina* exhibe una vaina vascular central rodeada de un parénquima acumulador de agua, y una anatomía Kranz con una distintiva capa periférica de células en empalizada conteniendo cloroplastos con pocas granas y sin almidón, y células Kranz que poseen cloroplastos con muchas granas y almidón. En cambio, *B. aralocaspica* muestra una capa de células de clorénquima en forma de empalizada localizada entre el tejido central de reserva de agua y las células de la hipodermis. Estas células de clorénquima radialmente elongadas poseen una vacuola central y una capa de citoplasma periférico con pocos cloroplastos en la parte distal (con respecto a la vaina vascular) de las células y una alta densidad de citoplasma, numerosos cloroplastos y grandes mitocondrias en la zona proximal. La grana y el contenido de almidón escasean en la región distal pero abundan en la región proximal. En cambio, los espacios de aire aparecen entre las células de la región distal pero son inexistentes en la zona proximal. En resumen, *B. aralocaspica* presenta dimorfismo cloroplastídico en una misma célula cuyo funcionamiento sustituiría el dimorfismo celular clásico de la anatomía Kranz, observable en *S. laricina*. En este contexto, *Su. heterophylla*, especie  $C_3$  perteneciente a la subfamilia *Salsoloideae*, carece de anatomía Kranz y exhibe dos a tres capas de grandes células mesofílicas en empalizada que contienen una gran vacuola central y una delgada lámina de cloroplastos en la periferia de las células, disposición común en células de plantas  $C_3$ . Los estudios bioquímicos complementarios en *B. aralocaspica* revelaron que la distribución intracelular en dos compartimentos perfectamente definidos, no sólo de las organelas sino también de las enzimas, contribuye a

eleva la concentración de  $CO_2$  en las cercanías de RUBISCO.

*B. aralocaspica* presenta similitud con las plantas  $C_4$  en la respuesta de la asimilación fotosintética de  $CO_2$  frente a concentraciones variables del  $O_2$  atmosférico y en la discriminación isotópica del carbono. Además, congruente con el transporte de compuestos de cuatro carbonos hacia los sitios de asimilación y de tres carbonos hacia los sitios de fijación de  $CO_2$  atmosférico, la RUBISCO y la NAD-ME están concentradas en la región proximal de las células, mientras que la PEP carboxilasa y la piruvato fosfato diquinasa son abundantes en la región distal. Aunque contienen RUBISCO en los escasos y pequeños cloroplastos, las células que reservan el agua y de la hipodermis no participan directamente en el proceso fotosintético porque carecen de las enzimas características de la vía  $C_4$ .

Un aporte diferente pero significativo para la comprensión de la evolución de las plantas  $C_4$ , fue el descubrimiento de elevadas actividades de las enzimas asociadas al metabolismo  $C_4$  en las células que circundan al xilema y floema de las plantas  $C_3$  (e.g., tabaco) y, además, la utilización del carbono suministrado como por el sistema vascular (Hibberd y Quick (2002)).

En conjunto, los hallazgos de Voznesenskaya *et al.* (2001a) y Hibberd y Quick (2002) sugieren que las transformaciones bioquímicas precedieron a los cambios anatómicos en la evolución de la fotosíntesis  $C_4$ , por las cuales un grupo mayoritario de especies evolucionó hacia la anatomía Kranz mientras que otras desarrollaron estructuras diferentes manteniendo la funcionalidad.

### Aspectos ecológicos

El funcionamiento de la fotosíntesis  $C_4$  requiere la acción concertada de procesos metabólicos y fisiológicos. En consecuencia, las plantas  $C_4$  podrían carecer de la habilidad observable en las plantas  $C_3$  para tolerar bajas irradiancias, temperaturas variables, o elevadas concentraciones de  $CO_2$ . Una falla en la coordinación funcional y estructural entre las células del mesófilo y de la vaina vascular puede llevar a una disminución en la eficiencia fotosintética (Sage y McKown, 2006). Aunque una disminución en la actividad de RUBISCO surge luego de un período prolongado a elevadas concentraciones de  $CO_2$ , las plantas  $C_3$  muestran una mayor capacidad para la aclimatación que las  $C_4$  (Long

*et al.*, 2004). Las plantas  $C_4$ , en cambio, no evidencian respuestas de este tipo, tal vez porque sus mecanismos intrínsecos obligan a RUBISCO y otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin a operar en condiciones de elevadas concentraciones de  $CO_2$  (Sage y Kubien, 2003). En general, las plantas  $C_4$  poseen una distribución ecológica y biogeográfica más restringida que las  $C_3$ , predominando en las zonas áridas y salinas del planeta (Sage y McKown, 2006). Tal vez, el metabolismo  $C_4$  constituya una forma de aclimatación de las especies  $C_3$  expuestas a perturbaciones ambientales durante plazos largos. Congruente con esta idea, la especie *Hedysaron fruticosum* una planta  $C_3$  de zonas áridas del norte de China (Niu *et al.*, 2006) cuya discriminación isotópica del carbono y anatomía foliar la sitúan entre las plantas  $C_3$  exhibe en ambientes desfavorables tasas fotosintéticas, usos del agua y actividades enzimáticas similares a las plantas  $C_4$ . Otras especies  $C_3$  en condiciones de estrés también desarrollan un metabolismo  $C_4$ . Aunque no exhibe una anatomía Kranz, *Hydrilla verticillata* (*Hydrocharitaceae*) responde como una planta  $C_4$  cuando la presión parcial de  $CO_2$  disminuye críticamente por anegamiento mientras que la especie anfibia *Eleocharis vivipara* (*Cyperaceae*) sumergida se comporta como una planta  $C_3$  pero adquiere un metabolismo  $C_4$ , con anatomía Kranz incluida, al adaptarse a una vida terrestre (Reiskind *et al.*, 1997; Ueno, 2001). Si estas especies deben ser consideradas intermedias  $C_3$ - $C_4$  es terreno de discusión.

### Aspectos metabólicos

Inicialmente, el punto de compensación caracterizaba las especies intermedias  $C_3$ - $C_4$  pero actualmente las bases metabólicas definen dicho comportamiento. Numerosas evidencias sugieren que las especies intermedias  $C_3$ - $C_4$  de los géneros *Alternanthera*, *Moricandia*, *Panicum* y *Parthenium* no poseen un metabolismo  $C_4$  que justifique sus bajas tasas de fotorrespiración. En las especies mencionadas, el  $CO_2$  no es transferido al ciclo de Benson-Calvin utilizando intermediarios de cuatro carbonos y las actividades de las enzimas del ciclo  $C_4$  son bajas (Rawsthorne, 1992). Una de las enzimas claves del metabolismo  $C_4$ , la PEP carboxilasa, representaría un ejemplo de las modificaciones moleculares y funcionales que acompañan los cambios anatómicos y fisiológicos en la evolución  $C_3$ - $C_4$ . La carboxilación irreversible del PEP mediante el  $HCO_3^-$  diferencia a la PEP

carboxilasa de las carboxilasas que reconocen al  $\text{CO}_2$  como sustrato (e.g. RUBISCO). La PEP carboxilasa, tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas (ca. 100 kDa), cumple importantes funciones en órganos no fotosintéticos mediante reacciones anapleróticas que suministran los metabolitos al ciclo de Krebs en las primeras fases de la evolución  $\text{C}_4$ . Estas características metabólicas confluyen a postular que los ancestros  $\text{C}_3$  estuvieron predispuestos para duplicar los genes dando la posibilidad de mantener las mutaciones sin afectar la fisiología del organismo. Si bien, la duplicación génica pudo originar los componentes de la vía  $\text{C}_4$  actual (Sage, 2004), un metabolismo eficiente requirió alteraciones en los patrones de expresión de los genes involucrados, principalmente a nivel del promotor (Svensson *et al.*, 2003). La isoforma fotosintética de la PEP carboxilasa se expresa solamente en las células del mesófilo mientras que los ortólogos no fotosintéticos se expresan en todos los órganos y tejidos. Por otra parte, las actividades que la enzima exhibe en el género *Flaveria* guardan estrecha relación con las características estructurales y fotosintéticas de la planta (Tabla 1).

La evolución de especies  $\text{C}_4$  a partir de ancestros  $\text{C}_3$ , tal como hoy se sostiene, llevó una considerable cantidad de años pero el advenimiento de la ingeniería genética introduce al hombre como un nuevo factor en esta conversión. Dos objetivos primaron en los intentos para aumentar la eficiencia fotosintética: la disminución de la fotorrespiración y la incorporación de mecanismos para aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  en las proximidades de RUBISCO (Raines, 2006). En general, la inactivación de los genes que codifican para las enzimas de la vía fotorrespiratoria arrojó resultados negativos, cuando no letales (Raines, 2006). Aunque se han obtenido resultados interesantes con la incorpora-

ción de genes propios del metabolismo  $\text{C}_4$  a plantas  $\text{C}_3$ , no se han comprobado alteraciones significativas en el metabolismo de la planta receptora (Tabla 2). Un aspecto importante es que el mecanismo de concentración del  $\text{CO}_2$  en la mayoría de las especies  $\text{C}_4$  depende de la separación espacial entre la fijación del  $\text{CO}_2$  atmosférico y su asimilación por el ciclo de Benson-Calvin. Aunque la fotosíntesis  $\text{C}_4$  no depende de una anatomía Kranz (Voznesenskaya *et al.*, 2001a), la evolución hacia dicho camino metabólico requiere la modificación anatómica que favorezca el mecanismo de acumulación de  $\text{CO}_2$  (Sage, 2004). Los intentos para sobreexpresar genes del metabolismo  $\text{C}_4$  en plantas  $\text{C}_3$  crearon un sistema basado en el funcionamiento intracelular sin tener en cuenta la adaptación anatómica, quizás por la ausencia de técnicas adecuadas para tal fin. Aunque el descubrimiento de metabolismo  $\text{C}_4$  monocelular permitiría obviar el dimorfismo celular (Reiskind *et al.*, 1997; Voznesenskaya *et al.*, 2001a, 2003) *B. aralocaspica* exhibe un ordenamiento subcelular que separa topográficamente la fijación del  $\text{CO}_2$  via PEP carboxilasa de la asimilación via RUBISCO. No sólo los aspectos anatómicos sino también los metabólicos (e.g. sobreexpresión de la anhidrasa carbónica, coexpresión simultánea de genes) deben ser incluidos en el diseño de las futuras líneas transgénicas (Raines, 2006).

Por otra parte, son destacables las alternativas experimentales que intentan aumentar la eficiencia fotosintética incrementando la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  en las cercanías de RUBISCO mientras mantienen la estructura de planta  $\text{C}_3$ . Extremadamente interesante fue la transformación de tabaco ( $\text{C}_3$ ) con un gen de cianobacterias implicado en acumular intracelularmente  $\text{CO}_2$  (Lieman-Hurwitz *et al.*, 2003). Estas nuevas

TABLA 1  
Evolución de la fotosíntesis  $\text{C}_4$  en el género *Flaveria*  
(Edwards *et al.*, 1987; Svensson *et al.*, 2003)

Parámetro	<i>F. pringley</i>	<i>F. linearis</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. brownii</i>	<i>F. trinervia</i>
Anatomía Kranz	No	Poco desarrollada	Poco desarrollada	Bien desarrollada	Bien desarrollada
Punto de compensación ( $\mu\text{bar}$ )	62	27	21	6	3
Actividad PEP carboxilasa ( $\mu\text{mol.mg Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	24	123	207	460	900
Ciclo $\text{C}_4$	-	+	++	+++	++++
Tipo de fotosíntesis	$\text{C}_3$	$\text{C}_3\text{-C}_4$	$\text{C}_3\text{-C}_4$	tipo $\text{C}_4$	$\text{C}_4$

líneas exhiben un aumento en la tasa fotosintética a concentraciones limitantes de  $CO_2$  pero no frente a concentraciones saturantes. Congruente con un aumento de la concentración de  $CO_2$  en las proximidades de RUBISCO, el punto de compensación en las plantas transgénicas fue menor que la contraparte silvestre. En este contexto, RUBISCO activasa, enzima que estimula la actividad de RUBISCO, surge como potencial objeto de estudio en los enfoques para aumentar la eficiencia fotosintética (Salvuci *et al.*, 2001; Raines, 2006). El conjunto de estos resultados permite vislumbrar la aparición de una nueva generación de estados de transición  $C_3$ - $C_4$ .

### Metabolismo intermedio $C_3$ - $C_4$

Aunque la secuenciación completa de los genomas de *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*) provee información valiosa sobre modelos de dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente, ambas especies exhiben fotosíntesis  $C_3$ . La reciente descripción del genoma completo de maíz, especie que podría constituirse como modelo para las  $C_4$ , abre nuevas y alentadoras expectativas.

La idea prevalente en los estudios evolutivos es que el metabolismo  $C_4$  surgió simultáneamente en linajes separados espacialmente como respuesta a los cambios

TABLA 2  
Impacto de la expresión de enzimas  $C_4$  en plantas  $C_3$  (Raines, 2006)

Enzima sobre-expresada	Planta receptora	Impacto sobre la fisiología	Impacto sobre el crecimiento	Referencia
PEP carboxilasa de maíz	Arroz	Aumento de la fotosíntesis bajo saturación lumínica. Disminución de la sensibilidad al $O_2$ de la fijación de $CO_2$	ND	Ku <i>et al.</i> (1999)
PEP carboxilasa de patata	Patata	El flujo de carbono cambia hacia aminoácidos. Estimulación de la NADP-malato deshidrogenasa endógena	Decoloración de hojas	Hausler <i>et al.</i> (2001)
Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Patata	Disminución en el contenido de piruvato, aumento en el de malato	ND	Ishimaru <i>et al.</i> (1998)
Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Arroz	Supresión de fotosíntesis Estimulación de la respiración Función estomática alterada	No visible fenotípicamente	Fukayama <i>et al.</i> (2002)
Piruvato ortofosfato diquinasa de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Tabaco	Sin efecto	Sin efectos	Sheriff <i>et al.</i> (1988)
NADP-malato deshidrogenasa de maíz	Arroz	Actividad NADP-malato deshidrogenasa 20 a 70 veces aumentada Cloroplastos anormales	Hojas atrofiadas y decoloradas	Takeuchi <i>et al.</i> (2000)
PEP carboxiquinasa de <i>Urochloa panicoides</i>	Arroz	Mayor flujo de $CO_2$ hacia compuestos $C_4$ Sin cambios en la fotosíntesis	Sin efectos	Tsuchida <i>et al.</i> (2001) Suzuki <i>et al.</i> (2000)
PEP carboxiquinasa de <i>Urochloa panicoides</i>	Tabaco	Sin efectos	Sin efectos	Hausler <i>et al.</i> (2001)
PEP carboxilasa de <i>Corynebacterium</i> + NADP-malato deshidrogenasa de <i>Flaveria</i>	Patata	Inhibición por $O_2$ atenuada	ND	Hausler <i>et al.</i> (1999)
PEP carboxilasa + Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Arroz	Aumento de la capacidad fotosintética	Aumento del rendimiento de granos	Ku <i>et al.</i> (2001)

en las condiciones ambientales, fundamentalmente el descenso de la concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$ . Esta separación filogenética generó un gran número de variantes que condujeron a la expresión del metabolismo  $\text{C}_4$  en diferentes líneas. Esta característica y los escasos datos sobre los genomas de las especies cuyo metabolismo alterna entre las vías  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  constituyen una dificultad para sugerir un mecanismo general. Aunque existen géneros muy estudiados, e.g. *Flaveria*, éste no constituiría un modelo para otras especies porque no serían similares los caminos evolutivos y el desarrollo alcanzado. Por ello, la presente revisión describe ejemplos de plantas  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  típicas para establecer el estado del conocimiento y, en consecuencia, vislumbrar las perspectivas de las líneas de investigación que se encaren en el futuro.

### Alloteropsis

La especie *Alloteropsis semialata* (*Poaceae*) incluye subespecies tipo  $\text{C}_3$  (ssp. *eckloniana*) y  $\text{C}_4$  (ssp. *semialata*). La subespecie *eckloniana* exhibe una anatomía Kranz anómala en la cual las células del mestoma (la capa interna de la vaina vascular) poseen abundantes cloroplastos y mitocondrias. Las células del mesófilo y del mestoma acumulan RUBISCO y glicina descarboxilasa pero los niveles de enzimas  $\text{C}_4$  son bajos. La anatomía Kranz de la subespecie *semialata* también es anómala pero contiene niveles elevados de las enzimas implicadas en el metabolismo  $\text{C}_4$  dependiente de PEP carboxiquinasa. La PEP carboxilasa, la piruvato ortofosfato diquinasa y la glicina descarboxilasa particionan diferencialmente entre las células del mesófilo y las de la vaina vascular mientras que RUBISCO se encuentra en ambos tipos de células. Ambas subespecies de *Alloteropsis semialata* contendrían metabolismos intermedios con un uso potencial en los estudios sobre la evolución  $\text{C}_4$  (Ueno y Sentoku, 2006).

### Moricandia

*Brassicaceae* es una familia agronómicamente importante que incluye numerosas especies hortícolas y oleaginosas. Aunque la mayoría de las especies poseen fotosíntesis  $\text{C}_3$ , los géneros *Moricandia*, *Diploaxis* y *Brassica* exhiben la vía intermedia  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  (Apel *et al.*, 1997). Dada la facilidad para implementar hibridiza-

ciones en esta familia, un trabajo reciente estudió los cruzamientos entre *Moricandia arvensis* ( $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$ ) y *Brassica oleracea* ( $\text{C}_3$ ) (Ueno *et al.*, 2007). Los puntos de compensación y las tasas fotosintéticas de los híbridos obtenidos exhibieron valores intermedios a las especies parentales. La transmisión de estos caracteres permite vislumbrar el aumento de la eficiencia fotosintética mediante la incorporación de rasgos  $\text{C}_4$  en especies  $\text{C}_3$ , objetivo para el cual se ha propuesto utilizar el gen de glicina descarboxilasa de la especie intermedia (*Moricandia nitens* en este caso) como marcador selectivo (Zhang *et al.*, 2004).

### Eleocharis

Como la especie *Hydrilla verticillata* (*Hydrocharitaceae*), que desarrolla fotosíntesis  $\text{C}_4$  en condiciones de anegamiento (Rao *et al.*, 2006), otras especies acuáticas pertenecientes a los géneros *Neostapfia*, *Tuctoria* y *Orcuttia* (Tribu *Orcuttieae* - *Poaceae*) evolucionaron también hacia dicho metabolismo (Keeley, 1998). En cambio, la especie anfibia *Eleocharis vivipara* expresa características  $\text{C}_4$  en vida terrestre y se comporta como  $\text{C}_3$  cuando está sumergida. Aunque la expresión de genes  $\text{C}_4$  no está vinculada al desarrollo de la anatomía Kranz (Uchino *et al.*, 1998), la forma terrestre exhibe bien desarrollada dicha morfología en su tallo (culm) con definidas características  $\text{C}_4$ , mientras que la forma acuática no conserva el dimorfismo celular y expresa bioquímicamente la fotosíntesis  $\text{C}_3$ . La transición de la forma  $\text{C}_4$  a la  $\text{C}_3$  procede gradualmente cuando las plantas terrestres son sumergidas pero el cambio inverso ocurre comparativamente más rápido cuando plantas acuáticas son transferidas al aire (Agarie *et al.*, 2002). Notablemente, la adición del ácido abscísico al agua induce la formación de nuevos tallos con anatomía Kranz y metabolismo  $\text{C}_4$  en las plantas sumergidas sugiriendo la participación de esta hormona en la implementación de esta vía fotosintética (Ueno, 1998).

### Flaveria

El género *Flaveria*, perteneciente a la familia *Asteraceae*, ha recibido particular atención en los últimos años debido a la presencia de especies con diferentes estados de transición  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$ . Aunque su utilización para el estudio del metabolismo  $\text{C}_4$  fue relativizada (Brown

TABLA 3  
Tipos fotosintéticos del género *Flaveria* (McKown et al., 2005)

$C_3$	$C_3$ - $C_4$	tipo- $C_4$	$C_4$
<i>F. cronquistii</i>	<i>F. angustifolia</i>	<i>F. brownii</i>	<i>F. australasica</i>
<i>F. mcdougalli</i>	<i>F. anomala</i>	<i>F. haumanii</i> (o $C_4$ )	<i>F. bidentis</i>
<i>F. pringley</i>	<i>F. chloraefolia</i>	<i>F. kochiana</i> (o $C_4$ )	<i>F. campestris</i>
<i>F. robusta</i>	<i>F. floridana</i>	<i>F. palmeri</i>	<i>F. trinervia</i>
	<i>F. linearis</i>	<i>F. vaginata</i>	
	<i>F. oppositifolia</i>		
	<i>F. pubescens</i>		
	<i>F. ramosissima</i>		
	<i>F. sonorensis</i>		

et al., 2005), resulta interesante para seguir la evolución de (i) los mecanismos de concentración de  $CO_2$ , (ii) la fotorrespiración (Ku et al., 1991; McKown et al., 2005), (iii) las actividades enzimáticas  $C_4$  (Casati et al., 1999; Westhoff y Gowik, 2004) y (iv) las transformaciones genéticas (Chu et al., 1997). Este género posee 23 especies conocidas, de las cuales algunas son  $C_3$  o  $C_4$  (del tipo NADP-ME) estrictas y otras intermedias cuyos estados de transición han sido subclasificados en  $C_3$ - $C_4$  intermedios o tipo- $C_4$  (Cheng et al., 1988) (Tabla 3).

El estudio filogenético de McKown et al. (2005) demostró dos orígenes independientes que parten de ancestros  $C_3$  para los estados intermedios ( $C_3$ - $C_4$ ; tipo- $C_4$ ). Congruente con esta condición ancestral, las especies con fotosíntesis  $C_3$  están restringidas a las porciones basales de la filogenia (Sage, 2004). Aunque el paradigma actual sostiene que las especies intermedias representan sobrevivientes que se encuentran en evolución hacia una fotosíntesis  $C_4$ , algunos investigadores sugieren que ellas no tienen posibilidades de evolucionar más allá de su estado actual (Edwards y Ku, 1987; Monson y Moore, 1989; McKown et al., 2005).

### *Salsola*

El primer caso descrito de metabolismo intermedio  $C_3$ - $C_4$  dentro de la familia *Chenopodiaceae* fue *Salsola arbusculiformis* (Voznesenskaya et al., 2001b). El análisis de las especies pertenecientes a la tribu *Salsoleae* resulta sumamente interesante para entender la evolu-

ción de la fotosíntesis  $C_4$  y los mecanismos de adaptación que las plantas ponen en juego frente a condiciones ambientales desfavorables. Los estudios fisiológicos indican que la mayoría de las especies del género *Salsola* presentan fotosíntesis  $C_4$ , dependiente de la NADP-ME. La anatomía Kranz en este género está caracterizada por cloroplastos dimórficos pero difiere con el tipo de fotosíntesis  $C_4$ . La grana de los cloroplastos de las células del mesófilo en las especies NADP-ME está mucho más desarrollada que en las células de la vaina vascular, mientras que la morfología plastídica en las especies NAD-ME es la inversa (Voznesenskaya et al., 2003). Algunas especies dentro de la tribu *Salsoleae* (*Chenopodiaceae*) presentan una fotosíntesis  $C_3$  en los cotiledones durante la embriogénesis y postgerminación pero desarrollan un metabolismo  $C_4$  en hojas y tallos verdes (Voznesenskaya et al., 1999). Las bases anatómicas y fisiológicas de esta transición se han identificado en *Salsola richteri* (Voznesenskaya et al., 2003). Después de cinco días de crecimiento en presencia de luz, las hojas adquieren las características  $C_4$  (compartimentalización de PEP carboxilasa y RUBISCO), y llegan al estado maduro con una anatomía Kranz totalmente desarrollada y una fotosíntesis  $C_4$  enteramente funcional.

### Conclusiones

El surgimiento de mecanismos para la utilización eficiente del carbono atmosférico y del  $H_2O$  facilitó la expansión de los vegetales en los medios inhóspitos.

Uno de estos mecanismos, la fotosíntesis  $C_4$  suministró a las plantas terrestres la tolerancia tanto a la disminución del  $CO_2$  atmosférico y del  $H_2O$  como al aumento de la temperatura ambiental. Notables avances fueron logrados últimamente en los estudios de los genomas, las características bioquímicas, las estructuras anatómicas y los rasgos fisiológicos del metabolismo  $C_4$ . Sin embargo, ciertas especies toleraron los ambientes tórridos y secos pero no progresaron en la adquisición de esta capacidad por las restricciones impuestas por su genoma. En este contexto, las plantas  $C_3$ - $C_4$  constituyen «fósiles vivientes» cuyo estudio, concertadamente con las líneas transgénicas provistas por la ingeniería genética, es adecuado para dilucidar el camino seguido por la plantas  $C_4$  durante la evolución. Pero más importante, la información provista por las plantas  $C_3$ - $C_4$  aportará herramientas para un diseño racional de especies eficientes que no sólo toleren los cambios impuestos por la sociedad en el medio ambiente sino también utilicen los terrenos (semi)desérticos para una agricultura que satisfaga los requerimientos alimenticios y energéticos futuros.

## Referencias bibliográficas

- AGARIE, S.; KAI, M.; TAKATSUJI, H.; UENO, O. (2002). «Environmental and hormonal regulation of gene expression of  $C_4$  photosynthetic enzymes in the amphibious sedge». *Eleocharis vivipara*. *Plant Science*, 163, 571-580.
- APEL, P.; HORTSMAN, G.; PflIEFFER, M., (1997). «The *Morinda* syndrome in species of the *Brassicaceae*: evolutionary aspects». *Photosynthetica*, 33, 205-215.
- BROWN, J. B.; PARSELEY, K.; HIBBERD, J. M. (2005). «The future of  $C_4$  research - maize, *Flaveria* or *Cleome*?». *Trends in Plant Science* 10(5), 215-221.
- CASATI, P.; FRESCO, A. G.; ANDREO, C. S.; DRINCovich, M. F. (1999). «An intermediate form of NADP-malic enzyme from the  $C_3$ - $C_4$  intermediate species». *Flaveria floridana*. *Plant Science*, 147, 101-109.
- CERLING, T. E.; HARRIS, J. M.; MACFADEN, B. J.; LEAKEY, M. G.; QUADE, J.; EISENMANN, V.; EHRLINGER, J. R. (1997). «Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary». *Nature*, 389, 153-158.
- CHENG, S.; MOORE, B.; EDWARDS, G. E.; KU, M. (1988). «Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a  $C_4$ -like species». *Plant Physiology*, 87, 867-873.
- CHU, C.; QU, N.; BASSÜNER, B.; BAUWE, H. (1997). «Genetic transformation of the  $C_3$ - $C_4$  intermediate plant, *Flaveria pubescens* (Asteraceae)». *Plant Cell Reports*, 16, 715-718.
- DRINCovich, M. F.; CASATI, P.; ANDREO, C. S. (2001). «NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways». *FEBS Letters*, 490, 1-6.
- DUVALL, M. R.; SAAR, D. E.; GRAYBURN, W. S.; HOLBROOK, G. P. (2003). «Complex transitions between  $C_3$  and  $C_4$  photosynthesis during the evolution of Paniceae: A phylogenetic case study emphasizing the position of *Steinchisma hians* (Poaceae), a  $C_3$ - $C_4$  intermediate». *International Journal of Plant Science*, 164, 949-958.
- EDWARDS, G. E.; KU, M. S. B. (1987). En: *The Biochemistry of Plants*. Ed. M. D. Hatch, N. K. Boardman. Academic Press (New York), 275-325.
- EHRLINGER, J. R.; SAGE, R. F.; FLANAGAN, L. B.; PEARCY, R. W. (1991). «Climate change and the evolution of  $C_4$ ». *Tree*, 6, 95-99.
- FUKUYAMA, H.; TAMAI, T.; TSUCHIDA, H.; MIYAO-TOKUTOMI, M. (2002). «Overproduction of the maize  $C_4$ -specific PEPC enhances the respiration under illumination in transgenic rice plants». *Plant and Cell Physiology*, 43, 173-173.
- HATCH, M. D. (1987). « $C_4$  photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure». *Biochimica et Biophysica Acta*, 895, 81-106.
- HAUSLER, R. E.; RADEMACHER, T.; LI, J.; LIPKA, V.; FISCHER, K. L.; SCHUBERT, S.; KREUZALER, F.; HIRSCH, H. J. (2001). «Single and double overexpression of  $C_4$ -cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants». *Journal of Experimental Botany*, 52, 1785-1803.
- HAUSLER, R. E.; KLEINES, M.; UHRIG, H.; HIRSCH, H. J.; SMETS, H. (1999). «Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the  $CO_2$  compensation point ( $\gamma^*$ ) and enhances dark and light respiration in transgenic potato». *Journal of Experimental Botany*, 50, 1231-1242.
- HIBBERD, J. M.; QUICK, W. P. (2002). «Characteristics of  $C_4$  photosynthesis in stems and petioles of  $C_3$  flowering plants». *Nature*, 415, 451-454.
- ISHIMARU, K.; OHKAWA, Y.; ISHIGE, T.; TOBIAS, D. J.; OHSUGI, R. (1998). «Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in  $C_3$  transgenic potato with a  $C_4$  maize PPDK gene». *Physiologia Plantarum*, 103, 340-346.
- KEELEY, J. E. (1998). « $C_4$  photosynthetic modifications in the evolutionary transition from land to water in aquatic grasses». *Oecologia*, 116, 85-97.
- KEELEY, J. E.; RUNDEL, P. W. (2003). «Evolution of CAM and  $C_4$  carbon-concentrating mechanisms». *International Journal of Plant Science*, 194, 555-577.
- KENNEDY, R. A.; LAESTCH, W. M. (1974). «Plant species intermediate for  $C_3$ ,  $C_4$  photosynthesis». *Science*, 184, 1087-1089.
- KU, M. S. B.; CHO, D. H.; LI, X.; JIAO, D. M.; PINTO, M.; MIYAO, M.; MATSUOKA, M. (2001). «Introduction of genes encoding  $C_4$  photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences». In *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality* (eds. J.A. Goode & D.C. Chadwich), pp. 100-116. John Wiley & Sons, NY, USA.
- KU, M.; WU, J.; DAI, Z.; SCOTT, R. A.; CHU, C.; EDWARDS, G. (1991). «Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species». *Plant Physiology*, 96, 518-528.
- LIEMAN-HURWITZ, J.; RACHMILEVITCH, S.; MITTLER, R.; MARCUS, Y.; KAPLAN, A. (2003). «Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express *ictB*, a gene involved in  $HCO_3^-$  accumulation in cyanobacteria». *Plant Biotechnology J*, 1, 43-50.
- LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; ORT, D. R.

- (2004). «Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future». *Annual Review of Plant Biology*, 55, 591-628.
- LUNN, J. E. (2007). «Compartmentation in plant metabolism». *Journal of Experimental Botany*, 56, 35-47.
- LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. (1997). «Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of  $C_4$  plants». *Planta*, 202, 106-111.
- MAJERAN, W.; CAI, Y.; SUN, Q.; VAN WIJK, K. J. (2005). «Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics». *The Plant Cell*, 17, 3111-3140.
- MCKOWN, A. D.; MONCALVO, J. M.; DENGLER, N. (2005). «Phylogenia of *Flaveria* (Asteraceae) and inference of  $C_4$  photosynthesis evolution». *American Journal of Botany*, 92, 1911-1928.
- MONSON, R. K.; MOORE, B. D. (1989). «On the significance of  $C_3$  -  $C_4$  intermediate photosynthesis to the evolution of  $C_4$  photosynthesis». *Plant, Cell and Environment*, 12, 689-699.
- MONSON, R. K. (2003). «Gene duplication, neofunctionalization, and the evolution of  $C_4$  photosynthesis». *International Journal of Plant Science*, 164, S43-S54.
- NIU, S.; JIANG, G.; WAN, S.; LI, Y.; GAO, L.; LIU, M. (2006). «A sand-fixing pioneer  $C_3$  species in sadland displays characteristics of  $C_4$  metabolism». *Environmental and Experimental Botany*, 57, 123-130.
- OSBORNE, C. P.; BEERLING, D. J. (2006). «Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of  $C_4$  plants». *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 3, 61, 173-194.
- PRICE, G. D.; VON CAEMMERER, S.; EVANS, J. R.; YU, J.-W.; LLOYD, J.; OJA, V.; KELL, P.; HARRISON, K.; GALLAGHER, A.; BADGER, M. R. (1994). «Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic  $CO_2$  assimilation». *Planta*, 193, 331-340.
- RAINES, C.A. (2006). «Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the  $C_3$  carbon fixation cycle». *Plant, Cell and Environment*, 29, 331-339.
- RAO, S. K.; FUKUYAMA, H.; REISKIND, J. B.; MIYAO, M.; BOWES, G. (2006). «Identification of  $C_4$  responsive genes in the facultative  $C_4$  plant *Hydrilla verticillata*. *Photosynthesis Research*, 88, 173-183.
- RAWSTHORNE, S. (1992). « $C_3$ - $C_4$  intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression». *The Plant Journal* 2, 267-274.
- REISKIND, J. B.; MADSEN, T. V.; VAN GINKEL, L. C.; BOWES, G. (1997). «Evidence that inducible  $C_4$ -type photosynthesis is chloroplastic  $CO_2$ -concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot». *Plant, Cell and Environment*, 20, 211-220.
- SAGE, R. F.; KUBIEN, D. S. (2003). «*Quo vadis C<sub>4</sub>*? An ecophysiological perspective on global change and the future of  $C_4$  plants». *Photosynthesis Research*, 77, 209-225.
- SAGE, R. F.; MCKOWN, A. D. (2006). «Is  $C_4$  photosynthesis less phenotypically plastic than  $C_3$  photosynthesis?» *Journal of Experimental Botany*, 57, 303-317.
- SAGE, R. F. (2004). «The evolution of  $C_4$  photosynthesis». *New Phytologist*, 161, 341-370.
- SALVUCCI, M. E.; OSTERYOUNG, K.W.; CRAFTS-BRANDNER, S.J.; VIERLING, E. (2001). «Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo*». *Plant Physiology* 127, 1053-1064.
- SCHNABEL, S. P.; WARE, D.; FULTON, R. S. *et al.* 2009. «El genoma del maíz B73: complejidad, diversidad y dinámica». *Science* 326, 1112-1115.
- SHERIFF, A.; MEYER, H.; RIEDEL, E.; SCHMITT, J. M.; LAPKE, C. (1998). «The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a  $C_3$  plant with respect to the intracellular location of the enzyme». *Plant Science*, 136, 43-57.
- SUZUKI, S.; MURAI, N.; BURNELL, J. N.; ARAI, M. (2000). «Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express  $C_4$ -type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Urochloa panicoides*. *Plant Physiology*, 124, 163-172.
- SVENSSON, P.; BLÄSING, O. E.; WESTHOFF, P. (2003). «Evolution of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414, 180-188.
- TAKEUCHI, K.; AKAGI, H.; KAMASAWA, N.; OSUMI, M.; HONDA, H. (2000). «Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme». *Planta*, 211, 265-274.
- TSUCHIDA, H.; TAMAI, T.; FUKUYAMA, H.; AAGARIE, S.; NOMURA, M.; ONODERA, H.; ONO, K.; NISHIZAKA, Y.; LEE, B.-H.; HIROSE, S.; TOKI, S.; KU, M. S. B.; MATSUOKA, M.; MIYAO, M. (2001). «High level expression of  $C_4$ -specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a  $C_3$  plant, rice». *Plant and Cell Physiology*, 42, 138-145.
- UCHINO, A.; SENTOKU, N.; NEMOTO, K.; IISHII, R.; SAMEJIMA, M.; MATSUOKA, M. (1998). « $C_4$ -type gene expression is not directly dependent on Kranz anatomy in an amphibious sedge *Eleocharis vivipara* Link». *The Plant Journal*, 14, 565-572.
- UENO, O.; SENTOKU, N. (2006). «Comparison of leaf structure and photosynthetic characteristics of  $C_3$  and  $C_4$  *Alloteropsis semialata* subspecies». *Plant, Cell and Environment*, 29, 257-268.
- UENO, O. (1998). «Induction of Kranz anatomy and  $C_4$ -like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid». *The Plant Cell*, 10, 571-583.
- (2001). «Environmental regulation of  $C_3$  and  $C_4$  differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiology*, 127, 1524-1532.
- UENO, O.; BANG, S. W.; WADA, Y.; KOBAYASHI, N.; KANEKO, R.; KANEKO, Y.; MATSUZAWA, Y. (2007). «Inheritance of  $C_3$ - $C_4$  intermediate photosynthesis in reciprocal hybrids between *Morandia arvensis* ( $C_3$ - $C_4$ ) and *Brassica oleracea* ( $C_3$ ) that differ in their genome constitution». *Plant Production Science*, 10, 68-79.
- VON CAEMMERER, S.; QUINN, V.; HANCOCK, N.C.; PRICE, G. D.; FURBANK, R.T.; LUDWIG, M. (2004). «Carbonic anhydrase and  $C_4$  photosynthesis: a transgenic analysis». *Plant, Cell and Environment*, 27, 697-703.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; ARTYUSHEVA, E. G.; FRANCESCHI, V. R.; PYANKOV, V. I.; KIIRATS, O.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. (2001b). «*Salsola arbusculiformis*, a  $C_3$ - $C_4$  intermediate in *Salsola* (*Chenopodiaceae*). *Annals of Botany*, 88, 337-348.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; ARTYUSHEVA, E. G.; BLACK, C. C.; OYANKOV, V. I.; EDWARDS, G. E. (2003). «Development of the  $C_4$  photosynthetic apparatus in cotyledons and leaves of *Salsola richteri* (*Quenopodiaceae*). *International Journal of Plant Science*, 164, 471-487.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; KIIRATS, O.; FREITAG, H.; EDWARDS, G. E. (2001a). «Kranz anatomy is not

- essential for terrestrial  $C_4$  plant photosynthesis». *Nature*, 414, 543-546.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; PYANKOV, V. I.; EDWARDS, G. E. (1999). «Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe *Salsoleae* (*Chenopodiaceae*)». *Journal of Experimental Botany*, 50, 1779-1795.
- WESTHOFF, P.; GOWIK, U. (2004). «Evolution of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria*». *Annals of Botany*, 93, 13-23.
- ZHANG, C.; XU, G.; HUANG, R.; CHEN, C.; MENG, J. (2004). «A dominant *gdcP*-specific marker derived from *Morinda nitens* used for introducing the  $C_3$ - $C_4$  character from *M. nitens* into *Brassica* crops». *Plant Breeding*, 123, 438-443.

# Las especies $C_4$ y el estrés ambiental

FERNANDO E. PRADO\*

MARIANA ROSA\*

y MIRNA HILAL\*

## Resumen

La distribución de las plantas se halla condicionada principalmente por los factores ambientales (estresores), los cuales tienden a ejercer un efecto selectivo hacia aquellas mejor adaptadas. El grado máximo de dicha selectividad es el que corresponde a la capacidad de reproducción; lo que significa que si una planta no es capaz de reproducirse no podrá prosperar en una comunidad. Surge así el concepto de estrés que puede definirse como todo factor externo que afecta negativamente el crecimiento, productividad y reproducción de las plantas. De acuerdo a su origen los estreses se agrupan en dos grandes categorías: abióticos o ambientales y bióticos o biológicos; siendo los primeros los que más afectan la vida de las plantas, razón por la cual son los más estudiados. En la problemática del estrés, las características funcionales y metabólicas de las plantas juegan un papel muy importante en el establecimiento del grado de resistencia o tolerancia que una especie exhibe hacia una determinada situación desfavorable. En ese contexto, las especies  $C_4$  poseen características fisiológicas propias que hacen que las mismas aparezcan como más resistentes que las  $C_3$ , a las condiciones de estrés ambiental que con más frecuencia se enfrentan las plantas tanto nativas como cultivadas.

## Summary

Plant distribution is principally conditioned by environmental factors (stressors); which tend to exercise a selective effect toward those better adapted. Maximum grade of this selectivity corresponds to the reproduction capacity; what means that if a plant is not able to reproduce it won't be able to grow into a community. Stress can be defined as all external factor that negatively affects the growth, productivity and reproduction of plants. According to origin stresses are grouped into in two main categories: abiotic or environmental stress factors and biotic or biological stress factors; being the first ones those that more affect the plant life, and for this reason they are the most studied. Into the stress problematic, functional and metabolic characteristics of plants play a very important role at the moment to establish the resistance or tolerance extent that a species exhibits in relation to a certain unfavorable situation. In this context,  $C_4$  species possesses physiological characteristics which make

they that appear as more resistant than  $C_3$  species under more frequent conditions of environmental stress that native or cultivated plants confront.

## El estrés vegetal

La distribución de las especies vegetales se halla condicionada, en mayor o menor medida, por los factores ambientales (Amzallag y Lerner, 1995; Hawkesford, 2001; Rhodes y Nadolska-Orczyk, 2001). Éstos tienden a ejercer un efecto selectivo hacia aquellas especies mejor adaptadas para soportar, un cierto grado de apartamiento de la normalidad frente a una dada situación ambiental. El grado máximo de dicha selectividad es el que corresponde a la capacidad de reproducción; es decir, si una planta no es capaz de reproducirse no podrá prosperar en una determinada comunidad (Boyer, 1982; Chapin III, 1991). Dentro de esta selectividad existe toda una gradación de situaciones de origen ambiental que afectan el normal desarrollo de las plantas (Leshem y Kuiper, 1996). Surge así el concepto de estrés vegetal, que puede ser definido como todo factor externo que afecte negativamente el crecimiento, productividad y capacidad reproductiva o de supervivencia de las plantas (Levitt, 1980; Larcher, 1995; Lüttge, 1997). El concepto es amplio y abarca desde aquellas situaciones de ocurrencia casi normal y repetitiva a lo largo del tiempo, hasta otras que suceden en forma no periódica y que pueden o no presentarse en un determinado período de tiempo.

## Las plantas frente al estrés

Independientemente de su naturaleza, las situaciones desfavorables tienden a producir cambios o daños celulares que invariablemente resultan en una altera-

\* Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 - CP 4000 San Miguel de Tucumán Argentina.

ción metabólica. No obstante, esta consideración no siempre resulta cierta por cuanto algunas especies se desarrollan mejor en ambientes estresantes, aparentemente menos aptos, que en otros más benignos y por ende supuestamente más ventajosos. Dentro de este contexto un terreno salino resultaría siempre beneficioso para una especie halófila; pero para sobrevivir en dicho hábitat la mayoría de dichas especies utilizan estrategias adaptativas que requieren un gasto energético extra (Reimann, 1992; Wang *et al.*, 1997). Ante esta situación surge la siguiente pregunta: ¿la planta se encuentra o no bajo estrés? La respuesta a este cuestionamiento y a otros similares, ha llevado a algunos autores a considerar al estrés como un concepto *relativo*, absolutamente dependiente del conjunto de respuestas que exhiben las especies frente a una dada situación desfavorable (Tadeo, 2000).

## Clasificación del estrés

Atendiendo a su origen los factores de estrés, también llamados *estresores*, pueden dividirse en dos grandes grupos: *abióticos o ambientales* y *bióticos o biológicos*, incluyendo dentro de estos últimos a los de origen antropogénico.

### Estrés abiótico o ambiental

El estrés abiótico incluye desde deficiencias o excesos de agua y nutrientes minerales, pasando por altos contenidos salinos de los suelos, altas o bajas temperaturas extremas, excesiva radiación solar (PAR, UVB), excesiva alcalinización o acidificación de los suelos y factores mecánicos (compactación de los suelos, viento, nieve, granizo) hasta la presencia de contaminantes químicos en los suelos (metales pesados, agentes xenobióticos, etc.) o en el aire (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), HF, nitrato de peroxiacetilo, etc.). A pesar de que éstos últimos se incluyen dentro de los factores abióticos, son generados en la mayoría de los casos por la actividad humana.

### Estrés biótico o biológico

El estrés biótico comprende desde agentes patógenos (virus, bacterias, hongos), pasando por animales

herbívoros, competencia e interacciones alelopáticas hasta actividades antropogénicas (incendios, deforestación, sobrepastoreo, actividades industriales, gases contaminantes, polución urbana, lluvia ácida, etc.).

Esta división no es del todo absoluta ya que algunas veces resulta bastante dificultoso establecer el verdadero origen del factor estresante; por ejemplo, en algunos casos de incendios forestales la elevación de la temperatura en zonas cercanas al foco del siniestro llega a ser lo suficientemente alta para afectar la vida de las plantas, sin haber sido el fuego por sí mismo el real causante del estrés. Por otra parte, en la naturaleza las situaciones estresantes raramente se presentan en forma aislada e independiente, ya que, por lo general, las mismas involucran a diversos estresores que interactúan de manera más o menos compleja según la situación presentada; así por ejemplo, la acidez del suelo puede potenciar la fitotoxicidad del aluminio en aquellas zonas ricas en este elemento. Del mismo modo, la salinidad y las bajas temperaturas pueden inducir severos déficits hídricos (Lichtenthaler, 1996; Rhodes y Nadolska-Orczyk, 2001; Joern y Mole, 2005).

## Fisiología del estrés

Las respuestas de las plantas a los factores estresantes pueden ser de tipo constitutivo o facultativo.

### Respuestas constitutivas

Dentro de éstas se incluyen aquellos mecanismos que teniendo su origen en la información genética preexistente en la planta, sirven para contrarrestar la situación desfavorable (Amzallag y Lerner, 1995). Los mecanismos constitutivos que confieren resistencia o tolerancia se hallan frecuentemente incluidos en el término *adaptaciones*. Las adaptaciones pueden ser de carácter anatomomorfológico o metabólico. Ejemplos de adaptaciones morfológicas son el desarrollo de pubescencia y el depósito de cera en las hojas, la aparición de espinas en lugar de hojas, el desarrollo de succulencia, la presencia de órganos reservantes y la caducifolia, entre otros. Un importante ejemplo de adaptación metabólica es la fotosíntesis C<sub>4</sub> y su variante CAM, que por sus características operativas, entre otras cosas, reducen en forma significativa la fotorespiración incrementando la eficiencia fotosintética a temperatu-

ras más elevadas y permiten un uso más eficiente del agua, que las especies que presentan fotosíntesis  $C_3$  (Monson, 1989; Lawlor, 2001; Sage, 2004).

### Respuestas inducibles o facultativas

Muchas plantas, cuando son expuestas a niveles subletales de estrés durante un determinado período de tiempo, muestran un cierto acomodamiento y/o tolerancia a la condición de estrés, que sería letal o produciría efectos deletéreos si las plantas no estuviesen pretratadas. Esta clase de resistencias se conoce con el nombre de *aclimatación o endurecimiento* (Mooney y Winner, 1991; Amzallag y Lerner, 1995; Smirnoff, 1995). La aclimatación metabólica también conocida como adaptación metabólica facultativa son respuestas a largo término que las plantas evocan frente a una determinada situación de estrés a fin de ajustar y orientar su fisiología hacia la condición ambiental imperante en dicho momento. Sin embargo, no todas las respuestas son específicamente orientadas por el ambiente y no todas las especies responden de la misma manera (Amzallag y Lerner, 1995; Joern y Mole, 2005). Desde este punto de vista y para tener una visión más completa del término aclimatación, resulta necesario establecer para cada especie, el denominado *óptimo fisiológico* que refleja las propiedades funcionales del individuo y el *óptimo ecológico* que se relaciona con la capacidad de supervivencia de dicho individuo en un ecosistema (Schulze *et al.*, 2005).

Asimismo, ciertas adaptaciones metabólicas facultativas pueden contribuir a contrarrestar la situación de estrés cuando las respuestas constitutivas son superadas; por ejemplo, los carotenoides y el ciclo fotorespiratorio oxidativo (PCO) en las plantas  $C_3$  representan la protección constitutiva contra el exceso de radiación lumínica (Kozaki y Takeba, 1996). Sin embargo, cuando la intensidad de la luz excede la capacidad de capturar electrones por los fotosistemas, la defensa constitutiva es complementada por el mecanismo facultativo del ciclo de las xantofilas (Hall y Rao, 1994).

La existencia de respuestas inducibles o facultativas llevó a Larcher a definir un nuevo concepto de estrés, al proponer los términos *eu-estrés* y *dis-estrés* para diferenciar entre los factores estresantes que producen efectos beneficiosos o estimulantes para las plantas (*eu-estrés*) de aquellos cuyas acciones resultan deletéreas o nocivas (*dis-estrés*) (Larcher, 1995; Lichtenthaler, 1996). De

acuerdo a este enfoque y según Lichtenthaler (1988), «un estrés moderado puede activar el metabolismo celular incrementando la actividad fisiológica de la planta sin causar ningún efecto negativo aun a largo tiempo, resultando dicho estrés favorable para la planta». Según esta última consideración la acción del factor estresante resulta ser dosis-dependiente; es decir, según sea la intensidad del estresor actuante los efectos sobre la planta podrán ser dañinos o beneficiosos. Como un ejemplo de esto, tenemos el caso de algunos reguladores del crecimiento que a bajas dosis estimulan el desarrollo de la planta mientras que a dosis elevadas actúan como herbicidas (Arteca, 1996). Una situación similar es la que se observa en el uso de ciertos herbicidas tal el caso del *bentazon* utilizado para combatir malezas en los cultivos de maíz y trigo. Estos cultivos luego de la aplicación del herbicida muestran también una sensible disminución inicial en la capacidad de asimilación de  $CO_2$  de modo similar a lo que ocurre con las malezas, pero a diferencia de éstas, luego de un cierto tiempo exhiben una completa recuperación de la tasa asimilatoria debido a la propiedad que tienen sus células de detoxificar, vía hidroxilación, el *bentazon*, lo que no ocurre con las malezas que acaban muriendo (Fedtke, 1982).

### El estrés y la productividad de las plantas

Aunque algunas condiciones estresantes de origen biótico pueden llegar a adquirir una relativa importancia en determinadas regiones, son las de naturaleza abiótica las que afectan en mayor medida el desarrollo y productividad de las plantas en los ecosistemas naturales y en los cultivos agrícolas (Boyer, 1982; Carlsson, 1993) (Fig. 1).

Al analizar los criterios de desarrollo y productividad debe tenerse en cuenta no sólo las características de las plantas sino también su pertenencia; dado que, si se trata de individuos integrantes de un ecosistema natural, dichos criterios quedan circunscriptos sólo al potencial reproductivo, ya que si éste resulta inadecuado o insuficiente los individuos tienden a desaparecer de la población. En el caso de los cultivos este potencial se torna secundario por cuanto lo que más interesa aquí no es la perpetuación de la especie sino la obtención de plantas o partes de éstas económicamente valiosas (Boyer, 1982). En función de esta premisa, la mayor parte de los estudios tendientes a dilucidar los mecanis-

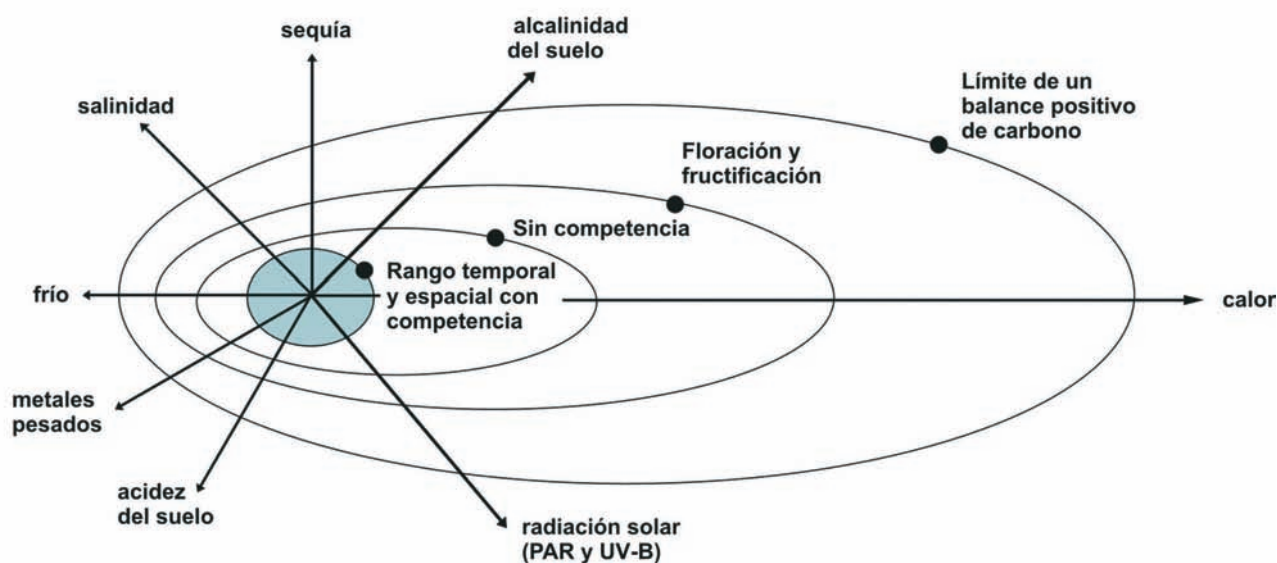


Figura 1. Diagrama de los factores de estrés abiótico a los que pueden estar expuestas las plantas  $C_4$  y CAM. (Basado en Schulze *et al.*, 2005, modificado).

mos involucrados en la resistencia o tolerancia de las plantas frente al estrés abiótico han sido realizados sobre especies cultivadas de interés comercial y preferentemente orientados hacia la sequía, salinidad y bajas temperaturas (Berry y Björkman, 1980; Serrano, 1996; Rosa *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2005). Sin embargo, en los últimos años como consecuencia del incremento en la contaminación urbana e industrial, se ha observado un aumento considerable en los estudios sobre estrés por metales pesados y por radiación UV-B (Ballaré *et al.*, 1996; Kabata-Pendias y Pendias, 2000; Searles *et al.*, 2001; Hilal *et al.*, 2004; Podazza *et al.*, 2006).

Entre las características a tener en cuenta cuando se analiza la problemática del estrés se destacan, por su trascendencia, la fisiología y la clase de fotosíntesis que presenta la especie a estudiar. Así, resultará necesario conocer si se trata de una especie halófila o glicófila, xerófila o mesófila, sensible o resistente a las bajas o altas temperaturas, con fotosíntesis  $C_3$ ,  $C_4$  o CAM, etc. (Amzallag y Lerner, 1995; Bohnert *et al.*, 1995; Serrano, 1996; Rhodes y Nadolska-Orczyk, 2001; Bohnert *et al.*, 2006). Dentro de este contexto, en los últimos tiempos ha cobrado mucha importancia el empleo de las denominadas especies *extremófilas*, tal el caso de *Thellungiella halophila* (Taji *et al.*, 2004) y *Craterostigma plantagineum* (Bianchi *et al.*, 1991) como modelos para estudiar las respuestas metabólicas y fisiológicas a distintas clases de estrés, con la finalidad de obtener datos que puedan ser aplicados luego en la biotecnología agrícola (Inan *et al.*, 2004; Amtmann *et al.*, 2005).

## Las especies $C_4$ y el estrés ambiental

Teniendo en cuenta que las situaciones de estrés más frecuentes afectan, en mayor o menor grado, el *status hídrico* de las plantas, resulta de suma importancia analizar los mecanismos involucrados en su mantenimiento cuando éstas se encuentran en una situación desfavorable. El agua, por sus múltiples funciones, resulta imprescindible para la vida de los organismos vivos sean éstos de origen animal, vegetal o microbiano (Lehninger *et al.*, 1993). Aunque muchas especies han adquirido a lo largo de la evolución los mecanismos necesarios para regular y mantener su potencial hídrico dentro de ciertos parámetros, muchas otras no lo han conseguido por lo que resultan muy sensibles a las situaciones de sequía, salinidad o bajas temperaturas (Bohnert *et al.*, 1995; Serrano, 1996; Hawkesford, 2001).

Dentro de este contexto y por las características bioquímicas y fisiológicas de su fotosíntesis se destacan las especies denominadas  $C_4$  y su variante CAM. Las plantas  $C_4$ , pero sobre todo, las CAM son muy eficientes en el uso del agua, lo que les permite prosperar mejor que las especies  $C_3$  en los ambientes áridos y semiáridos (Ehleringer *et al.*, 1997; Sage y Kubien, 2003; Sage, 2004; Schulze *et al.*, 2005). Aunque la distribución taxonómica en las espermatofitas y algunas pteridofitas así como por el número de especies, parecen sugerir un origen más remoto para el carácter CAM, son las especies  $C_4$  las que presentan una distri-

bución más amplia. Así, mientras las especies CAM se localizan preferentemente en los desiertos costeros con noches frías (Namibia, Chile, Baja California y Tenerife, entre otros), las  $C_4$  son dominantes en las savanas y praderas tropicales y subtropicales con veranos cálidos y lluviosos (Schulze *et al.*, 2005). El hecho de encontrarse especies  $C_4$  tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas así como la coexistencia de especies  $C_3$  y  $C_4$  en un mismo taxón e incluso dentro de una misma familia o género sugieren un origen polifilético y reciente para este tipo de plantas (Monson, 1989).

A pesar de que las plantas  $C_4$  engloban un número mucho menor de especies que las  $C_3$ , incluyen algunas de gran importancia económica tanto desde el punto de vista industrial tal el caso de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*); así como desde el agrícola-ganadero entre las que podemos incluir al pasto horqueta (*Paspalum notatum*), pasto macho (*Paspalum urvillei*), grama Rhodes (*Chloris gayana*), pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*), grama azul (*Bouteloua gracilis*) y otras potencialmente importantes pertenecientes, entre otros, a los géneros *Atriplex*, *Digitaria* y *Amaranthus* (Bogdan, 1969; Jones, 1985; Kardereit *et al.*, 2003).

La ventaja ecofisiológica que poseen las plantas  $C_4$  frente a las de tipo  $C_3$ , que les permite ser más productivas y tolerar mejor las altas temperaturas y las restricciones hídricas predominantes en las zonas áridas y semiáridas (Ehleringer *et al.*, 1997; Brown, 1999; Sage, 2004), ha llevado a algunas investigaciones a procurar introducir el metabolismo  $C_4$  en algunos cultivos de gran importancia agronómica pero que corresponden a especies  $C_3$ , tal el caso del arroz (Ku *et al.*, 1999; Sage, 2000; Takeuchi *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta el presente los resultados no han sido los esperados, entre otras cosas, por la complejidad anatomofuncional que conlleva aparejada la fotosíntesis  $C_4$ ; no obstante ello se continúa trabajando en el tema. Por otra parte, a pesar del enorme potencial económico que encierran estos estudios, no debe dejarse de lado el hecho de que tal mejora no podrá aplicarse a todos los cultivos; ya que en aquellos que sólo crecen en zonas templadas y templada-frías la misma no será beneficiosa sino todo lo contrario, ya que podrá acarrear disminuciones en los rindes (Sage, 2002; Kubien y Sage, 2004). Esta última suposición se basa en el hecho de que fotosíntesis  $C_4$  es fenotípicamente menos plástica que la fotosíntesis  $C_3$  (Sage y McKown, 2006); lo que determina una ecodistribución más restringida

para las especies con fotosíntesis  $C_4$  (Sage y Kubien, 2003; Sage, 2004; Schulze, *et al.*, 2005). Asimismo, la mejor eficiencia en el uso del agua, derivada del tipo de fotosíntesis, que presentan las especies  $C_4$ , sólo resulta importante en las especies que poseen el metabolismo CAM; por cuanto muchas de las especies  $C_4$  nativas y cultivadas cuando crecen en condiciones de sequía exhiben tasas de asimilación similares a las especies  $C_3$  (Schulze, *et al.*, 2005). Así, la potencial ventaja en la economía hídrica que presentarían las especies  $C_4$ , derivada de su menor conductividad estomática, no sería usada por éstas para evadir el estrés hídrico en los suelos secos pero sí en los salinos (Kappen *et al.*, 1976; Suarez *et al.*, 2001). No obstante, el hecho de que algunas especies  $C_4$  pertenecientes al género *Atriplex* se comporten como xero-halófitas, hallándose muy bien adaptadas para tolerar tanto condiciones de sequía extremas como altos niveles salinos, ha conducido a que las mismas sean utilizadas como modelos de estudio para dilucidar los mecanismos fisiológicos y aislar los genes involucrados en la resistencia a la sequía y salinidad a fin de poder, con las herramientas que brinda la tecnología genómica, trasladar dicha resistencia a aquellos cultivos que no se desarrollan bien o son incapaces de crecer en regiones áridas y suelos salinos (Zhu y Meinzer, 1999; Le Houérou, 2000; Shen *et al.*, 2002; Cabello-Hurtado y Ramos, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Bohnert *et al.*, 2006).

Los estudios que abarcaron tanto aspectos metabólicos como moleculares, pusieron de manifiesto que en las plantas  $C_4$  sal-tolerantes y sequía-tolerantes ocurren los mismos eventos y responden de un modo similar a como lo hacen sus parientes  $C_3$ . Así, la síntesis de osmolitos compatibles (azúcares solubles, aminoácidos, polioles, aminos cuaternarios), de poliaminas, de ácido abscísico (ABA), de proteínas de estrés (dehidrinas), de enzimas eliminadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS scavenging enzymes) y la expresión de genes que codifican quinasas, proteínas que unen  $Ca^{+2}$  y  $Na^+/H^+$  antiporte transportadores, entre otras, también han sido demostradas en las especies  $C_4$  resistentes al estrés salino e hídrico (Bohnert *et al.*, 1995; Zhu, 2000; William Hamilton III *et al.*, 2001; Winicov, 2001; Suarez *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2006).

Sin embargo, no todas las especies  $C_4$ , entre las que se incluyen la mayoría de interés económico, son tolerantes a la salinidad y sequía, razón por la cual también ellas han sido objeto de estudios tendientes a incrementar su tolerancia a dichas condiciones, a fin de aumen-

tar su productividad en aquellas regiones que no resulten aptas para su cultivo (Alberico y Cramer, 1993; Brown *et al.*, 1995; Fortmeier y Schubert, 1995; Seligmann, 1997; Du *et al.*, 1998; Dewey, 2005).

Las plantas  $C_4$  se caracterizan por presentar una mayor tasa asimilatoria que las  $C_3$  cuando las temperaturas son elevadas (Berry y Björkman, 1980; Ehleringer *et al.*, 1997; Lawlor, 2001); lo que determina que tales especies sean dominantes en las regiones cálidas con altas intensidades lumínicas y poco abundantes o ausentes en regiones de clima frío, aún en aquellas con elevada irradiación solar tal el caso de las altas montañas (Long, 1983; Sage, 2002; Sage y Sage, 2002). Si bien no existe una explicación convincente para este comportamiento de las plantas  $C_4$ , dos son las hipótesis más aceptadas actualmente: una sostiene que la fotosíntesis  $C_4$  resulta más lábil al frío que la  $C_3$  debido a que las enzimas piruvato-fosfato diquinasa (PPDK) y fosfoenolpirúvico carboxilasa (PEP) del ciclo  $C_4$  sufren una disociación molecular con pérdida de actividad cuando las temperaturas son inferiores a 10°C (Krall y Edwards, 1993). La otra, por su parte, considera que la menor performance de la fotosíntesis  $C_4$  se debe a que el rendimiento cuántico de ésta es inferior al de la fotosíntesis  $C_3$  cuando la temperatura desciende por debajo de 20 °C (Ehleringer *et al.*, 1997). Si a estas consideraciones se les suma la demostración de que el volumen correspondiente a las células de la vaina no puede incrementarse por una limitación espacial de las hojas, con la concomitante inhibición del aumento en el contenido de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco); necesario para compensar la menor actividad fotosintética impuesta por las temperaturas bajas, se puede llegar a tener una explicación más convincente sobre el comportamiento de las especies  $C_4$  en los climas templados o templado-fríos (Pittermann y Sage, 2001; Sage y McKown, 2006). Sin embargo, la existencia de algunas especies  $C_4$  adaptadas a climas fríos (Sage y Sage, 2002; Sage y McKown, 2006), ha llevado a postular que por el poco tiempo evolutivo transcurrido desde la aparición de la fotosíntesis  $C_4$ , las especies de este tipo no han tenido el tiempo suficiente para adaptarse a los climas menos cálidos (Ehleringer y Monson, 1993; Sage y Sage, 2002). No obstante, se están llevando a cabo algunas investigaciones fisiológicas y bioquímicas tendientes a dilucidar el real comportamiento de la plantas  $C_4$  frente a las bajas temperaturas, con la finalidad de que, una vez logrado, proceder, mediante técnicas biotecnológi-

cas, a modificarlo para poder de este modo expandir la frontera de muchos de los cultivos  $C_4$  que hoy no pueden hacerlo por las limitaciones que impone el clima frío (Matsuoka *et al.*, 2001; Sage, 2002; Kubien *et al.*, 2003; Naidu *et al.*, 2003; Naidu y Long, 2004).

Con relación al estrés térmico, si bien por las investigaciones realizadas con especies  $C_3$  resulta conocido que las altas temperaturas afectan tanto la capacidad fotosintética como la estabilidad de las membranas celulares, induciendo asimismo la síntesis de las denominadas proteínas de choque térmico (HSP) así como la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mahan *et al.*, 1997; Anderson, 2004); las llevadas a cabo en algunas especies  $C_4$  de interés agronómico tal el caso del maíz, sorgo, caña de azúcar y gramíneas forrajeras han sido enfocadas más al estudio de determinadas alteraciones metabólicas que a tratar de dilucidar los mecanismos operantes frente al estrés térmico (Rathnam, 1978; Sampietro *et al.*, 1980; Nieto-Sotelo y Ho, 1986; Williams III *et al.*, 1986; Howarth y Skøt, 1994). El menor interés despertado por este tipo de estrés, probablemente, obedezca al hecho de que las especies  $C_4$  soportan mejor las temperaturas elevadas que sus congéneres  $C_3$  (Ehleringer *et al.*, 1997; Sage y Kubien, 2003). Sin embargo, ante el proceso de cambio climático global que está ocurriendo actualmente (Melillo *et al.*, 1993; Sánchez-Díaz *et al.*, 2004), los problemas derivados de las altas temperaturas tenderán a incrementarse por lo que en un futuro no muy lejano, es probable que el estrés térmico pase a ocupar los primeros planos junto con la salinidad y la sequía dentro de las investigaciones sobre estrés abiótico.

En relación al estrés causado por la deficiencia en nutrientes, el porcentaje de investigaciones llevadas a cabo en plantas  $C_4$  resulta mucho menor que el correspondiente a los estreses anteriores (Brown y Wilson, 1983; Meinzer y Zhu, 1998). No obstante, algunos trabajos combinados entre especies  $C_3$  y  $C_4$ , en condiciones naturales, han puesto de manifiesto que bajo condiciones de suministro limitado de N en las regiones templadas y templada-frías, las plantas  $C_3$  tienen una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) debido a la tasa transpiratoria más alta que presentan respecto a las  $C_4$  (Schmitt y Edwards, 1981; Gebauer *et al.*, 1987; Sage y Percy, 1987). Sin embargo, en los climas cálidos son estas últimas las que exhiben NUE más elevadas y por lo tanto distributivamente predominan sobre las  $C_3$  (Medina, 1993). Por otra parte, también se han efectuado estudios sobre

deficiencias de elementos minerales así como sobre la interacción micorriza-planta, en relación a la absorción de P y otros nutrientes minerales (Pearson y Rengel, 1997).

A partir de los años setenta pero con un fuerte incremento desde mediados de la década del 80, se comenzó a analizar la problemática de los desequilibrios ambientales ocasionados, entre otros, por los efluentes industriales, los residuos urbanos y las emisiones de gases contaminantes sobre el desarrollo de las plantas y la productividad de los cultivos (Cincotta *et al.*, 2000). En ese contexto las investigaciones relacionadas a los metales pesados y la radiación UV-B, han alcanzado una gran significación en los últimos años (Ernst *et al.*, 1992; Turner, 1994; Kabata-Pendias y Pendias, 2000). A pesar de que la mayor parte de los estudios fueron realizados en especies  $C_3$  (Poschenrieder y Barceló, 2004), algunas especies  $C_4$  tal el caso del maíz y ciertas halófitas del género *Atriplex* (Kidd *et al.*, 2001; Lutts *et al.*, 2004; Chiu *et al.*, 2005), que naturalmente se comportan como tolerantes frente a determinados metales pesados por la propiedad que poseen sus células de sintetizar péptidos específicos (fitoquelatinas, metalotioneínas) capaces de secuestrar los contaminantes metálicos (Cobbett y Goldsbrough, 2002), se están utilizando como modelos a fin de poder dilucidar los mecanismos operantes en dicha tolerancia para luego poder transferirlos a otras especies de interés y aumentar así su resistencia. Respecto a los gases contaminantes, el incremento, que de un modo incontrolado, se produjo durante mucho tiempo en la emisión de los denominados CFCs (compuestos halogenados de carbono), halones (compuestos formados por Br, F y C), bromuro de metilo ( $\text{BrCH}_3$ ), HCFCs (compuestos hidrohalegenados de carbono) y  $\text{NO}_x$  (óxidos de nitrógeno), entre otros, ha llevado a que la capa protectora de ozono ( $\text{O}_3$ ) formada durante millones de años, comience a disminuir de manera bastante importante en muchas regiones del planeta con el consiguiente peligro que ello acarrea, debido a que el  $\text{O}_3$  estratosférico representa la principal barrera protectora frente a la dañina radiación UV-B solar (Rowland, 1989; Day, 2001; Schulze *et al.*, 2005). Ante este panorama y siendo las plantas organismos inmóviles, los potenciales efectos de dicha radiación resultan preocupantes; sobre todo a futuro teniendo en cuenta que las acciones emprendidas para reducir la destrucción de la capa de ozono no son todo lo efectivas que deberían ser, sobre todo porque las mismas encierran

decisiones de índole político y que los denominados países del primer mundo no quieren asumir (van der Leun *et al.*, 1998). Diversos son los efectos descriptos en relación a la radiación UV-B, tanto en trabajos de laboratorio como de campo. Los mismos incluyen desde alteraciones metabólicas tales como disminución de la actividad fotosintética, cambios en la actividad de diversas enzimas del ciclo de fijación del  $\text{CO}_2$ , daño al ADN, expresión de diversos genes, incremento en la síntesis de compuestos fenólicos (flavonoides, antocianos y otros fenoles), de lignina y de otros compuestos del metabolismo secundario, aumento de la cubierta cérica cuticular y alteración de la susceptibilidad a la herbivoría y al ataque de diversos organismos patógenos, hasta cambios anatomomorfológicos (alteración de la estructura lamelar del cloroplasto, aumento de espesor del mesófilo, disminución del tamaño de las hojas, inhibición de la elongación del hipocótilo, desarrollo de pubescencia foliar, disminución de la frecuencia estomática y cambios en la acumulación de biomasa, entre otros) (Lingakumar y Kulandaivelu, 1993; Barnes *et al.*, 1996; Nagel *et al.*, 1998; Kakani *et al.*, 2003; Hilal *et al.*, 2004). Si bien, la mayor parte de los trabajos sobre los efectos de la radiación UV-B han sido realizados en especies  $C_3$ , un buen número también se han llevado a cabo con especies  $C_4$  sobre todo en maíz, caña de azúcar, sorgo y algunas gramíneas forrajeras (Elawad *et al.*, 1985; Ambasht y Agrawal, 1995, 1998; Musil *et al.*, 2002; Kakani *et al.*, 2003). Aunque se han identificado algunas especies naturalmente resistentes a la radiación UV-B (Day *et al.*, 1992; Correia *et al.*, 1998; Kakani *et al.*, 2003), se desconoce hasta el presente cual/les es/son el/los mecanismo/s involucrado/s en dicha tolerancia. No obstante, la mayor parte de los trabajos para tal fin se han centrado sobre el estudio de los mecanismos, que controlan la expresión de diversos genes que codifican algunas de las enzimas involucradas en el camino biosintético de los flavonoides y otros compuestos fenólicos (Schnitzler *et al.*, 1996; Bachereau *et al.*, 1998; Woodall y Stewart, 1998) así como en el modo en que la radiación UV-B afecta la estructura y funcionamiento del cloroplasto y del ADN (Allen *et al.*, 1998; A.-H.-Mackerness y Jordan, 1999; Day, 2001; Hilal *et al.*, 2004). Por otra parte, también son muy escasos los relacionados a la interacción de la radiación UV-B con otros estreses ambientales que tienen gran significado sobre la distribución y persistencia de las especies  $C_4$  tal el caso de la salinidad, temperatura y sequía (Murphy, 1997; Kakani *et al.*,

2003; Caldwell *et al.*, 2003). De todas maneras resulta interesante destacar que prácticamente no se han encontrado diferencias de significación en las respuestas de las especies  $C_3$  y  $C_4$  al incremento de radiación UV-B, sobre todo en lo referente a la productividad (Teramura y Sullivan, 1991; Day y Neale, 2002; Kakani *et al.*, 2003).

En relación a la temática de la radiación UV-B, es necesario resaltar que se han encarado también estudios vinculando a este estrés con la conservación de los ecosistemas (Dobson *et al.*, 1997; Cincotta *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2005).

Finalmente hay que destacar que el mejoramiento adaptativo de las plantas, sobre todo las cultivadas, a la salinidad, sequía, bajas temperaturas, carencia de nutrientes, metales pesados, radiación UV-B, etc., permitiría lograr un significativo ahorro de recursos por cuanto con dicho mejoramiento se aumentaría la productividad sin ocasionar grandes cambios en el ambiente.

Como una conclusión final e imitando a Sage y Kubien (2003) —quienes emplearon la legendaria expresión latina *Quo vadis?* para referirse al futuro evolutivo de las especies  $C_4$  en relación al cambio global—, nosotros, en un futuro no muy lejano y con ayuda de la biotecnología, la genómica y proteómica, podremos decir apelando a la famosa frase de Julio César: *Vini, vidi, vinci*, para referirnos al comportamiento de las plantas  $C_4$  frente al estrés ambiental.

## Referencias bibliográficas

- A.-H.-MACKERNES, S., y JORDAN, B.R., 1999. «Changes in gene expression in response to ultraviolet B-induced stress». En: *Handbook of plant and crop stress*, 749-768. Ed. M. PESSARAKLI. Marcel Dekker Inc. New York (USA).
- ALBERICO, G.J., y CRAMER, G.R., 1993. «Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars». *Journal of Plant Nutrition*, 16, 2289-2303.
- ALLEN, D.J.; NOGUES, S., y BAKER, N.R., 1998. «Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis?». *Journal of Experimental Botany*, 49, 1775-1788.
- AMBASHT, N.K., y AGRAWAL, M., 1995. «Physiological responses of field grown *Zea mays* L. plants to enhanced UV-B radiation». *Biotronics*, 24, 15-23.
- 1998. «Physiological and biochemical responses of *Sorghum vulgare* plants to supplemental ultraviolet-B radiation». *Canadian Journal of Botany*, 76, 1290-1294.
- AMTMANN, A.; BOHNERT, H.J., y BRESSAN, R.A., 2005. «Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models». *Plant Physiology*, 138, 127-130.
- AMZALLAG, G.N., y LERNER, H.R., 1995. «Physiological adaptation of plants to environmental stresses». En: *Handbook of plant and crop stress*, 557-576. Ed. M. PESSARAKLI. Marcel Dekker Inc. New York (USA).
- ANDERSON, J., 2004. «El estrés por alta temperatura en las plantas». En: *La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis*, 223-251. Eds. M.J. RAIGOSA, N. PEDRIOL, y A. SÁNCHEZ. Thomson. Madrid (España).
- ARTECA, R.C., 1996. *Plant growth substances. Principles and applications*. Chapman & Hall. New York (USA), 332 pp.
- BACHEREAU, F.; MARIGO, G., y ASTA, J., 1998. «Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*». *Physiologia Plantarum*, 104, 203-210.
- BALLARE, C.L.; SCOPEL, A.L.; STAPLETON, A.E., y YANOVSKY, M.J., 1996. «Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA-integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*». *Plant Physiology*, 112, 161-170.
- BARNES, P.W.; BALLARE, C.L., y CALDWELL, M.M., 1996. «Photomorphogenetic effects of UV-B radiation on plant: consequences for light competition». *Journal of Plant Physiology*, 148, 15-20.
- BERRY, J., y BJÖRKMAN, O., 1980. «Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants». *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 491-543.
- BIANCHI, G.; MURELLI, C.; SALAMINI, F., y BARTELS, D., 1991. «Novel carbohydrate-metabolism in the resurrection plant *Cratogeomys plantagineum*». *Plant Journal*, 1, 355-359.
- BOGDAN, A.V., 1969. «Rhodes grass». *Herbage Abstracts*, 39, 1-13.
- BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E., y JENSEN, R.G., 1995. «Adaptations to environmental stresses». *The Plant Cell*, 7, 1099-1111.
- BOHNERT, H.J.; GONG, Q.; LI, P., y MA, S., 2006. «Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-getting genomics going». *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 180-188.
- BOYER, J.S., 1982. «Plant productivity and environment». *Science*, 218, 443-448.
- BROWN, R.H., 1999. «Agronomic implications of  $C_4$  photosynthesis». En:  *$C_4$  plant biology*, 473-507. Eds. R.F. SAGE, y R.K. MONSON. Academic Press. San Diego (USA).
- BROWN, R.H., y WILSON, J.R., 1983. «Nitrogen response of *Panicum* species differing in  $CO_2$  fixation pathways. II.  $CO_2$  exchange characteristics». *Crop Science*, 23, 1154-1159.
- BROWN, P.S.; KNIEVEL, D.P., y PELL, E.J., 1995. «Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities in mesophyll and bundle sheath cells of maize». *Physiologia Plantarum*, 95, 274-280.
- CABELLO-HURTADO, F., y RAMOS, J., 2004. «Isolation and functional analysis of the glycerol permease activity of two nodulin-like intrinsic proteins from salt stressed roots of the halophyte *Atriplex nummularia*». *Plant Science*, 166, 633-640.
- CALDWELL, M.M.; BALLARE, C.L.; BORMANN, J.F.; FLINT, S.D.; BJÖRN, O.; TERAMURA, A.H.; KULANDAIVELU, G., y TEVINI, M., 2003. «Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors». *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2, 29-38.
- CARLSSON, R., 1993. «Chenopodiaceae species: salt-tolerant plants for green biomass and grain production». En: *Handbook of plant and crop stress*, 543-558. Ed. M. PESSARAKLI. Marcel Dekker Inc. New York (USA).
- CINCOTTA, R.P.; WISNEWSKI, J., y ENGELMANN, R., 2000.

- «Human populations in the biodiversity hotspots». *Nature*, 404, 990-992.
- COBBETT, C., y GOLDSBROUGH, P., 2002. «Phytochelatin and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis». *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 53, 159-182.
- CORREIA, C.M.; AREAL, E.L.V.; TORRES-PEREIRA, M.S., y TORRES-PEREIRA, J.M.G. 1998. «Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects». *Field Crops Research*, 59, 81-89.
- CHAPIN III, F.S., 1991. «Integrated responses of plants to stress». *BioScience*, 41, 29-36.
- CHI, K.K.; YE, Z.H., y WONG, M.H., 2005. «Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents». *Chemosphere*, 60, 1365-1375.
- DAY, T.A., 2001. «Ultraviolet radiation and plant ecosystems». En: *Ecosystems, evolution, and ultraviolet radiation*, 80-117. Eds. C.S. COCKELL, y A.R. BLAUSTEIN. Springer-erlag. New York (USA).
- DAY, T.A.; VOGELMANN, T.C., y DELUCIA, E.H., 1992. «Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation?» *Oecologia*, 92, 513-519.
- DAY, T.A., y NEALE, P.J., 2002. «Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers». *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 371-396.
- DEWEY, D.W., 2005. «Physiological and genetic control of water stress tolerance in zoysiagrass». *PhD Thesis*. Texas A&M University (USA), 197 pp.
- DOBSON, A.P.; BRADSHAW, A.D., y BAKER, A.J.M., 1997. «Hopes for the future: restoration ecology and conservation biology». *Science*, 277, 515-522.
- DU, Y.C.; NOSE, A.; WASANO, K., y UCHIDA, Y., 1998. «Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and the  $C_4$  pathway in sugarcane (*Saccharum sp.*) leaves». *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 253-260.
- EHLERINGER, J.R.; CERLING, T.E., y HELLIKER, B.R., 1997. « $C_4$  photosynthesis, atmospheric  $CO_2$ , and climate». *Oecologia*, 112, 285-299.
- EHLERINGER, J.R. y MONSON, R.K., 1993. «Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation». *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 411-439.
- ELAWAD, S.H.; ALLEN JR, L.H., y GASCHO, G.J., 1985. «Influence of UV-B radiation and soluble silicates on the growth and nutrient concentration of sugarcane». *Proceedings of the Soil and Crop Science Society of Florida*, 44, 134-141.
- ERNST, W.H.O.; VERKLEIJ, J.A.C., y SCHAT, H., 1992. «Metal tolerance in plants». *Acta Botanica Neerlandica*, 41, 229-248.
- FEDTKE, C., 1982. *Biochemistry and physiology of herbicide action*. Springer-Verlag. Heidelberg (Germany), 202 pp.
- FORTMEIER, R., y SCHUBERT, S., 1995. «Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion». *Plant, Cell and Environment*, 18, 1041-1047.
- GEBAUER, G.; SCHUBERT, B.; SCHUMACHER, M.I.; REHDER, H., y ZIEGLER, H., 1987. «Biomass production and nitrogen content of  $C_3$  and  $C_4$  grasses in pure and mixed culture with different nitrogen supply». *Oecologia*, 71, 613-617.
- HAWKESFORD, M.J., 2001. «Introduction: the molecular analysis of plant adaptation to the environment». En: *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, 1-15. Eds. M.J. HAWKESFORD, y P. BUCHNER. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Netherlands).
- HALL, D.D., y RAO, K.K., 1994. *Photosynthesis*, 5<sup>th</sup> edn. Cambridge University Press. Cambridge (England), 211 pp.
- HILAL, M.; PARRADO, M.F.; ROSA, M.; GALLARDO, M.; ORCE, L.; MASSA, E.M.; GONZÁLEZ, J.A., y PRADO, F.E., 2004. «Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation». *Photochemistry and Photobiology*, 79, 205-210.
- HOWARTH, C.J., y SKØT, K.P., 1994. «Detailed characterization of heat shock protein synthesis and induced thermotolerance in seedlings of *Sorghum bicolor* L». *Journal of Experimental Botany*, 45, 1353-1363.
- INAN, G.; KHANG, Q.; LI, P.H.; WANG, Z.L.; ZHANG, H.; ZHANG, C.Q.; QUIST, T.M.; GOODWIN, S.M., y ZHU, J.H., 2004. «Salt cress: and halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability in molecular genetic analysis of growth and development of extremophiles». *Plant Physiology*, 135, 1718-1737.
- JOERN, A., y MOLE, S., 2005. «The plant stress hypothesis and variable responses by blue grama grass (*Bouteloua gracilis*) to water, mineral nitrogen, and insect herbivory». *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2069-2090.
- JONES, C.A., 1985.  *$C_4$  Grasses and cereals: growth, development and stress response*. John Wiley & Sons. New York (USA), 432 pp.
- KABATA-PENDIAS, A., y PENDIAS, H., 2000. *Trace elements in soil and plants*, 3<sup>rd</sup> edn. CRC Press. Florida (USA), 432 pp.
- KADEREIT, G.; BORSCH, T.; WEISING, K., y FREITAG, H., 2003. «Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of  $C_4$  photosynthesis». *International Journal of Plant Science*, 164, 959-986.
- KAKANI, V.G.; REDDY, K.R.; ZHAO, D., y SAILAJA, K., 2003. «Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review». *Agricultural and Forest Meteorology*, 120, 191-218.
- KAPPEN, L.; LANGE, O.L.; SCHULZE, E.D.; EVENARI, M., y BUSCHBOM, U., 1976. «Distributional pattern of water relations of *Hamada scoparia* (Pomel) Iljin in a desert environment». *Oecologia*, 23, 323-334.
- KIDD, P.S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B., y BARCELÓ, J., 2001. «The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.)». *Journal of Experimental Botany*, 52, 1339-1352.
- KOZAKI, A., y TAKEBA, G., 1996. «Photorespiration protects  $C_3$  plants from photooxidation». *Nature*, 384, 557-560.
- KRALL, J.P., y EDWARDS, G.E., 1993. «PEP carboxylases from two  $C_4$  species of *Panicum* with markedly different susceptibilities to cold inactivation». *Plant and Cell Physiology*, 34, 1-11.
- KU, M.S.B.; AGARIE, S.; NOMURA, M.; HIROSE, S.; TOKI, S.; MIYAO-TOKUTOMI, M., y MATSUOKA, M., 1999. «High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants». *Nature Biotechnology*, 17, 76-80.
- KUBIEN, D.S., y SAGE, R.F., 2004. «Low-temperature photosynthetic performance of a  $C_4$  grass and a co-occurring  $C_3$  grass native to high latitudes». *Plant, Cell and Environment*, 27, 907-916.
- KUBIEN, D.S.; VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R.T., y SAGE, R.F., 2003. « $C_4$  photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amount of Rubisco». *Plant Physiology*, 132, 1577-1585.
- LARCHER, W., 1995. *Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*, 3<sup>rd</sup> edn. Springer-Verlag. Heidelberg (Germany), 506 pp.

- LAWLOR, D.W., 2001. *Photosynthesis*, 3rd edn. Springer-Verlag. New York (USA), 386 pp.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L., y COX, M.M., 1993. *Principles of biochemistry*, 2nd edn. Worth Publishers. New York (USA), 1092 pp
- LE HOUEROU, H., 2000. «Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semiarid zones of West Asia and North Africa». *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 14, 101-135.
- LESHEM, Y.Y., y KUIPER, P.J.C., 1996. «Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress?». *Biologia Plantarum*, 38, 1-18.
- LEVITT, J., 1980. *Responses of plants to environmental stress*, vol. 1 y 2, 2nd edn. Academic Press. New York (USA).
- LICHTENTHALER, H.K., 1988. «*In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants». En: *Applications of chlorophyll fluorescence*, 129-142. Ed. H.K. LICHTENTHALER. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Netherlands).
- 1996. «Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants». *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.
- LINGAKUMAR, K., y KULANDAIVELU, G., 1993. «Changes induced by ultraviolet-B radiation in vegetative growth, foliar characteristics and photosynthetic activities in *Vigna unguiculata*». *Australian Journal of Plant Physiology*, 20, 299-308.
- LONG, S.P., 1983. «C<sub>4</sub> photosynthesis at low temperatures». *Plant, Cell and Environment*, 6, 345-363.
- LÜTTGE, U., 1997. *Physiological ecology of tropical plants*. Springer-Verlag. Berlin (Germany), 384 pp.
- LUTTS, S.; LEFEVRE, I.; DELPEREE, Ch.; KIVITS, S.; DECHAMPS, C.; ROBLEDÓ, A., y CORREAL, E., 2004. «Heavy metal accumulation by the halophyte species mediterranean salt-bush». *Journal of Environmental Quality*, 33, 1271-1279.
- MA, S.; GONG, Q., y BOHNERT, H.J., 2006. «Dissecting salt stress pathway». *Journal of Experimental Botany*, 57, 1097-1107.
- MAHAN, J.R.; MCMICHAEL, B.L., y WANJURA, D.F., 1997. «Reduction of high temperature stress in plants». En: *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*, 137-150. Eds. A.S. BASRA, y R.K. BASRA. Harwood Academic Publishers. Amsterdam (Netherlands).
- MARTÍNEZ, J.P.; KINET, J.M.; BAJJI, M., y LUTTS, S., 2005. «NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L.». *Journal of Experimental Botany*, 56, 2421-2431.
- MATSUOKA, M.; FURBANK, R.T.; FUKAYAMA, H., y MIYAO, M., 2001. «Molecular engineering of C<sub>4</sub> photosynthesis». *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 52, 297-314.
- MEDINA, E., 1993. «Mineral nutrition: tropical savannas». *Progress in Botany*, 54, 237-253.
- MELILLO, J.M.; MCGUIRE, A.D.; KICKLIGHTER, D.W.; MOORE, B.III.; VOROSMARTY, C.J., y SCHLOSS, A.L., 1993. «Global climate change and terrestrial net primary production». *Nature*, 363, 234-240.
- MEINZER, F.C., y ZHU, J., 1998. «Nitrogen stress reduces the efficiency of the C<sub>4</sub> CO<sub>2</sub> concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species». *Journal of Experimental Botany*, 49, 1227-1234.
- MONSON, R.K., 1989. «On the evolutionary pathways resulting in C<sub>4</sub> photosynthesis and crassulacean acid metabolism (CAM)». *Advances in Ecological Research*, 19, 57-110.
- MOONEY, H.A., y WINNER, W.E., 1991. «Partitioning response of plants to stress». En: *Response of plants to multiple stresses*, 499-518. Eds. H.A. MOONEY, W.E. WINNER, y E.J. PELL. Academic Press. San Diego (USA).
- MURPHY, T.M., 1997. «Resistance of plants to the effects of ultraviolet radiation». En: *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*, 151-190. Eds. A.S. BASRA, y R.K. BASRA. Harwood Academic Publishers. Amsterdam (Netherlands).
- MUSIL, C.F.; CHIMPHANGO, S.B.M., y DAKORA, F.D., 2002. «Effects of elevated ultraviolet-B radiation of native and cultivated plants of Southern Africa». *Annals of Botany*, 90, 127-137.
- NAGEL, L.M.; BASSMAN, J.H.; EDWARDS, G.E.; ROBBERECHT, R., y FRANCESHI, V.R., 1998. «Leaf anatomical changes in *Populus trichocarpa*, *Quercus rubra*, *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus ponderosa* exposed to enhanced ultraviolet-B radiation». *Physiologia Plantarum*, 104, 385-396.
- NAIDU, S.L.; MOOSE, S.P.; AL-SHOAIBI, A.K.; RAINES, C.A., y LONG, S.P., 2003. «Cold tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes». *Plant Physiology*, 132, 1688-1697.
- NAIDU, S.L., y LONG, S.P., 2004. «Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an *in vivo* analysis». *Planta*, 220, 145-155.
- NIETO-SOTELO, J., y HO, T.H.D., 1986. «Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots». *Plant Physiology*, 82, 1031-1035.
- PEARSON, J.N., y RENGEL, Z., 1997. «Mechanisms of plant resistance to nutrient deficiency stress». En: *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*, 213-240. Eds. A.S. BASRA, y R.K. BASRA. Harwood Academic Publishers. Amsterdam (Netherlands).
- PITTMANN, J., y SAGE, R.F., 2001. «The response of the high altitude C<sub>4</sub> grass *Muhlenbergia montana* (Nutt.) A.S. Hitchc. to long- and short-term chilling». *Journal of Experimental Botany*, 52, 829-838.
- PODAZZA, G.; ROSA, M.; GONZÁLEZ, J.A.; HILAL, M., y PRADO, F.E., 2006. «Cadmium induces changes in sucrose partitioning, invertase activities and membrane functionality in roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* L. Osbeck)». *Plant Biology*, 8, 706-714.
- POSCHENRIEDER, C., y BARCELÓ, J., 2004. «Estrés por metales pesados». En: *La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis*, 413-442. Eds. M.J. RAIGOSA, N. PEDRIOL, y A. SÁNCHEZ. Thomson. Madrid (España).
- RATHNAM, C.K.M., 1978. «Heat inactivation of leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: protection by aspartate and malate in C<sub>4</sub> plants». *Planta*, 141, 289-295.
- REIMANN, C., 1992. «Sodium exclusion by *Chenopodium* species». *Journal of Experimental Botany*, 43, 503-510.
- RHODES, D., y NADOLSKA-ORCZYK, A., 2001. «Plant stress physiology». En: *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7. John Wiley & Sons Ltd. Chichester (England).
- ROSA, M.; HILAL, M.; GONZÁLEZ, J.A., y PRADO, F.E., 2004. «Changes in soluble carbohydrates and related enzymes induced by low temperature during early developmental stages of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings». *Journal of Plant Physiology*, 161, 683-689.
- ROWLAND, F.S., 1989. «Chlorofluorocarbons and the depletion of stratospheric ozone». *American Scientist*, 77, 36-45.
- SAGE, R.F., 2000. «C<sub>3</sub> versus C<sub>4</sub> photosynthesis in rice: ecophysiological perspectives». En: *Redesigning rice photosynthesis to increase yield*, 13-35. Eds. J.E. SHEEHY, P.L. MITCHELL, y B.

- HARDY. International Rice Research Institute. Los Baños (Philippines).
- SAGE, R.F., 2002. «Variation in the  $k_{cat}$  of Rubisco in  $C_3$  and  $C_4$  plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature». *Journal of Experimental Botany*, 53, 609-620.
- SAGE, R.F., 2004. «The evolution of  $C_4$  photosynthesis». *New Phytologist*, 161, 341-370.
- SAGE, R.F., y KUBIEN, D.S., 2003. «Quo vadis  $C_4$ ? An ecophysiological perspective on global change and the future of  $C_4$  plants». *Photosynthesis Research*, 77, 209-225.
- SAGE, R.F., y MCKOWN, A.D., 2006. «Is  $C_4$  photosynthesis less phenotypically plastic than  $C_3$  photosynthesis». *Journal of Experimental Botany*, 57, 303-317.
- SAGE, R.F., y PEARCY, R.F., 1987. «The nitrogen use efficiency of  $C_3$  and  $C_4$  plants. II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.)». *Plant Physiology*, 84, 959-963.
- SAGE, R.F., y SAGE, T.L., 2002. «Microsite characteristics of *Muhlenbergia richardsonii* (Trin.) Rydb., an alpine  $C_4$  grass from the White Mountains, California». *Oecologia*, 132, 501-508.
- SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A., y PRADO, F.E., 1980. «A regulatory invertase from sugar cane leaf-sheaths». *Phytochemistry*, 19, 1637-1642.
- SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; IRIGOYEN, J.J.; GÓMEZ-CASANOVAS, N.; PARDO, A., y AZCON-BIEITO, J., 2004. «El cambio climático global. Efecto previsible del  $CO_2$  sobre los vegetales». En: *La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis*, 1111-1140. Eds. M.J. RAIGOSA; N. PEDRIOL y A. SÁNCHEZ. Thomson. Madrid (España).
- SCHMITT, M.R., y EDWARDS, G.E., 1981. «Photosynthetic capacity and nitrogen use efficiency of maize, wheat and rice: a comparison between  $C_3$  and  $C_4$  photosynthesis». *Journal of Experimental Botany*, 32, 459-466.
- SCHULZE, E.D.; BECK, E., y MÜLLER-HOHENSTEIN, K., 2005. *Plant ecology*. Springer-Verlag. Heidelberg (Germany), 702 pp.
- SEARLES, P.S.; FLINT, S.D., y CALDWELL, M.M., 2001. «A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion». *Oecologia*, 127, 1-10.
- SELIGMANN, H., 1997. «Transmission of acquired adjustments to salinity in *Sorghum bicolor*». *BioSystems*, 40, 257-261.
- SHEN, Y.G.; DU, B.X.; ZHANG, W.K.; ZHANG, J.S., y CHEN, S.Y., 2002. «AhCMO, regulated by stress in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco». *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 815-821.
- SERRANO, R., 1996. «Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses». *International Review of Cytology*, 165, 1-52.
- SMIRNOFF, N., 1995. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford (England), 270 pp.
- SCHNITZLER, J.P.; JUNGBLUT, T.P.; HELLER, W.; KÖFFERLEIN, M.; HUTZLER, P.; HEINZMANN, U.; SCHMELZER, E.; ERNST, D.; LANGEBAEELS, C., y SANDERMANN, H. Jr., 1996. «Tissue localization of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings». *New Phytologist*, 132, 247-258.
- SUÁREZ, L.A.; DELGADO, L.C.; LATINA, C.A.; ROSA, M.D.; HILAL, M., y PRADO, F.E., 2001. «Interpopulation variations in *Trichloris pluriflora* Fourn. germination under saline stress». *Bio Cell Supplement* 25, 72.
- SUÁREZ, L.A.; CANTERO, F.; ROSA, M.D.; PRADO, F.E., y Hilal, M., 2002. «Mecanismos adaptativos al estrés salino en poblaciones de *Trichloris pluriflora* Fourn». *Libro de Actas de la XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal, XXIV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal y I Congreso Uruguayo de Fisiología Vegetal*. Punta del Este (Uruguay), 3 pp. Formato digital.
- TADEO, F.R., 2000. «Fisiología de las plantas y el estrés». En: *Fundamentos de fisiología vegetal*, 481-498. Eds. J. AZCON-BIEITO, y M. TALON. McGraw Hill/Interamericana. Barcelona (España).
- TAJI, T.; SEKI, M.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIYAMA, K.; NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; ZHU, J.K., y SHINOZAKI, K., 2004. «Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray». *Plant Physiology*, 135, 1697-1709.
- TAKEUCHI, Y.; AKAGI, H.; KAMASAWA, N.; OSUMI, M., y HONDA, H., 2000. «Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme». *Planta*, 211, 265-274.
- TERAMURA, A.H., y SULLIVAN, J.H., 1991. «Potential impacts of increased solar UV-B on global plant productivity». En: *Photobiology*, 625-634. Ed. E. RIKLIS. Plenum Press. New York (USA):
- TURNER, A.P., 1994. «The responses of plants to heavy metals». En: *Toxic metals in soil-plant systems*, 153-187. Ed. S.M. ROSS. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester (England).
- WAN DER LEUN, J.C.; TANG, W., y TEVINI, M., 1998. «Environmental effects of ozone depletion: 1998 assessment». *United Nations Environment Programme (UNEP)*, 205 pp.
- WANG, L.W.; SHOWALTER, A.M., y UNGAR, I.A., 1997. «Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae)». *American Journal of Botany*, 84, 1247-1255.
- WILLIAM HAMILTON III, E.; MCNAUGHTON, S.J., y COLEMAN, J.S., 2001. «Molecular, physiological, and growth responses to sodium stress in  $C_4$  grasses from a soil salinity gradient in the Serengeti ecosystem». *American Journal of Botany*, 88, 1258-1265.
- WILLIAMS III, G.J.; MONSON, R.K., y DETTLING, J.K., 1986. «Growth temperature effects on chlorophyll fluorescence yield in 15 graminoid species». *American Midland Naturalist*, 116, 197-201.
- WINICOV, I., 2001. «Molecular strategies to overcome salt stress in agriculture». En: *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, 103-129. Eds. M. J. HAWKESFORD, y P. BUCHNER. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Netherlands).
- WOODALL, G.S., y STEWART, G.R., 1998. «Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*?». *Journal of Experimental Botany*, 49, 1447-1450.
- ZHU, J.K., y MEINZER, F.C., 1999. «Efficiency of  $C_4$  photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress». *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 79-86.
- ZHU, J.K., 2000. «Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis». *Plant Physiology*, 124, 941-948.



# Transiciones metabólicas en la fijación fotosintética del carbono en plantas del género *Portulaca*

MARÍA VALERIA LARA\*  
MARÍA FABIANA DRINCOVICH\*  
y CARLOS SANTIAGO ANDREO\*

## Resumen

Según la fijación del carbono las plantas superiores se clasifican en  $C_3$ ,  $C_4$  y plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Las especies  $C_3$  fijan el  $CO_2$  a través del ciclo de Calvin operante en las células del mesófilo. La fotosíntesis  $C_4$  requiere de la coordinación de las funciones de las células mesofílicas (CM) y de las células de la vaina vascular (CVV), las cuales presentan un complemento enzimático diferencial. El CAM es una adaptación a ambientes áridos: los estomas se cierran de día y se abren de noche; así, la fijación del carbono ocurre en un solo tipo celular, separándose temporalmente la fijación inicial del  $CO_2$  a través de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de la definitiva por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. Se conocen numerosas transiciones desde el metabolismo  $C_3$  a CAM, siendo *Mesembryanthemum crystallinum* la especie modelo. Sin embargo, la transición  $C_4$ -CAM sólo se ha descrito en *Portulaca* ( $C_4$ ), siendo muy interesante porque implica un cambio temporal en las vías involucradas en la captación del carbono sumada a la complejidad anatómica dada por el sistema CM-CVV-células de reserva de agua. En esta especie, la inducción del metabolismo CAM se logra como consecuencia del estrés por sequía.

## Summary

Higher plants can be classified as  $C_3$ ,  $C_4$  and CAM (Crassulacean Acid Metabolism), according to the photosynthetic pathway.  $C_3$  species fix  $CO_2$  through the Calvin Cycle operating in mesophyll cells (MC). In  $C_4$  plants, fully differentiated mesophyll and bundle sheath cells (BSC) with a different enzymatic complement cooperate to fix  $CO_2$ . On the other hand, CAM is a metabolic adaptation to arid environments: stomata are closed during much of the day and open at night. In this metabolism, carbon fixation takes place within a single cell but initial fixation of  $CO_2$  through phosphoenolpyruvate carboxylase occurs in a different time frame than the final fixation by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. The shift from  $C_3$  photosynthesis to CAM is well known in some species, with *Mesembryanthemum crystallinum* as model species. However, the  $C_4$ -CAM transition has only been described in *Portulaca* ( $C_4$ ). This is very interesting

because in addition to the complex anatomy involving MC-BSC-water storage cell, carbon primary  $CO_2$  fixation is temporally separated from secondary incorporation. In this species, the set up of the CAM is accomplished as a consequence of drought stress.

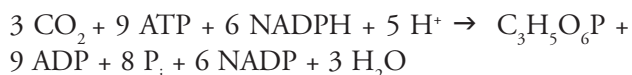
## Fijación fotosintética del carbono: el ciclo reductivo de las Pentosas Fosfato

La asimilación del  $CO_2$  es un proceso cíclico e involucra la producción neta de triosas-P. Así, el ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato (CRPF) está presente en casi todos los organismos fotoautotróficos: plantas verdes, bacterias quimioautotróficas, y en la mayoría de las bacterias anoxigénicas. Las especies vegetales que utilizan esta vía como único mecanismo para fijar el  $CO_2$  se conocen como plantas  $C_3$  debido a que el mencionado ciclo también se conoce como ciclo  $C_3$ .

El ciclo  $C_3$  es un proceso autocatalítico que involucra 13 etapas, las cuales transcurren en el estroma de los cloroplastos de las células fotosintéticas, y que pueden ser agrupadas en tres fases: carboxilación, reducción y regeneración (Robinson, y Walker, 1981). La reacción de carboxilación es catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) que combina a la molécula aceptora ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) con el  $CO_2$  (Andrews y Lorimer, 1987). El compuesto resultante es inestable, generando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. En la fase reductiva, este compuesto es fosforilado y reducido para formar gliceraldehído-1,3-bisfosfato (3-PGAL) utilizando el ATP y el NADPH producidos en la fase luminosa de la fotosíntesis. La regeneración de la RuBP es la fase final del ciclo, y requiere ATP y diez de las trece enzimas involucradas en esta vía. La mayoría del 3-PGAL producido es utilizado para regenerar el aceptor inicial RuBP. Sólo una de cada seis

\* Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

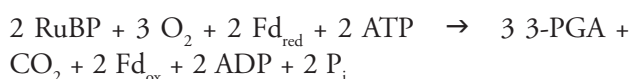
moléculas es liberada del ciclo. Así, las triosas-P producidas son utilizadas para sintetizar almidón en los mismos cloroplastos o bien exportadas para generar sacarosa en el citosol, la cual es transportada a través del floema hacia los tejidos no fotosintéticos para ser utilizada como fuente de energía y/o almacenamiento (ap Rees, 1984). La asimilación del  $\text{CO}_2$  puede resumirse de la siguiente manera:



## La fotorrespiración

La RuBisCO también cataliza una reacción oxidativa entre la RuBP y el  $\text{O}_2$  que involucra la producción de 3-PGA y glicolato-2-P (Lorimer, 1981). El  $\text{O}_2$  y el  $\text{CO}_2$  son muy similares, tanto en forma como en propiedades químicas, y compiten por el mismo sitio activo de la RuBisCO. A pesar de que la enzima posee mayor afinidad por el  $\text{CO}_2$  que por el  $\text{O}_2$ , la concentración en el aire de  $\text{O}_2$  es mucho mayor que la del  $\text{CO}_2$ . De esta manera, bajo condiciones fisiológicas, la actividad oxigenasa es un 20-30 % de la actividad carboxilasa. Sin embargo, a medida que la temperatura aumenta, el balance en el aire entre el  $\text{O}_2$  y el  $\text{CO}_2$  se modifica, y la reacción de carboxilación se vuelve menos dominante (Ogren, 1984; Tolbert, 1997).

El compuesto de dos átomos de carbono generado debe ser reciclado al CRPF a través de la vía metabólica conocida como Ciclo Fotosintético Oxidativo (CFO) o ciclo  $\text{C}_2$ . Este proceso también se denomina fotorrespiración ya que involucra el consumo de  $\text{O}_2$  y la liberación de  $\text{CO}_2$  en la luz. Así, el CRPF y el ciclo  $\text{C}_2$  transcurren simultáneamente en la hoja. A diferencia de la respiración, esta vía está acompañada del consumo de ATP. La fotorrespiración involucra la actividad coordinada de 16 enzimas y de más de 6 translocadores distribuidos en el cloroplasto, el peroxisoma y la mitocondria (Lorimer y Andrews, 1981). Por cada dos moléculas de glicolato-2-P metabolizados en el CFO se libera un carbono como  $\text{CO}_2$ , mientras que los otros tres carbonos retornan al CRPF. La ecuación neta de la fotorrespiración, a partir de RuBP, puede resumirse como sigue:



En algunos casos particulares, la fotorrespiración puede ser utilizada por la planta para su propia protección debido al alto consumo de ATP y NADPH de este proceso. Esta situación se produce cuando el CRPF no puede operar (por ejemplo cuando los estomas se encuentran cerrados por déficit de agua) y las hojas están expuestas a la luz, causando un daño severo a la hoja por la sobre-reducción de los transportadores de la cadena fotosintética. De esta forma, la planta utilizaría la vía fotorrespiratoria para eliminar el ATP y el NADPH producidos por la fase luminosa y que no son empleados por el CRPF, previniendo la fotoinactivación de la cadena de transporte cloroplástica (Kozaki y Takeba, 1996).

## El ciclo $\text{C}_4$

La fotosíntesis  $\text{C}_4$  es una adaptación de la vía  $\text{C}_3$  que supera la limitación de la fotorrespiración, aumentando la eficiencia fotosintética y minimizando la pérdida de agua en ambientes secos y/o de altas temperaturas. Las plantas que poseen esta vía fotosintética son denominadas plantas  $\text{C}_4$ , siendo la mayoría nativas de los trópicos y climas cálidos con elevadas intensidades de luz y altas temperaturas. Bajo estas condiciones, estas especies exhiben altas velocidades de crecimiento y de fotosíntesis debido a la ganancia en la eficiencia del uso de agua, carbono y nitrógeno (Hatch, 1992). Algunos de los cultivos y pasturas más productivos del mundo como maíz, caña de azúcar, sorgo y amaranto son plantas  $\text{C}_4$ ; además de muchas de las malezas.

En estas plantas, la fotorrespiración es suprimida al elevar la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio de localización de la RuBisCO, evitando la actividad oxigenasa de la enzima. Esto se logra a través de una bomba de  $\text{CO}_2$  basada en la separación espacial de la fijación con respecto a la asimilación del  $\text{CO}_2$  (Hatch, 1987). De esta manera, la mayoría de las especies poseen una anatomía particular en la cual las células mesofílicas (CM) y las células de la vaina vascular (CVV) cooperan para fijar el  $\text{CO}_2$  (Hatch y Osmond, 1976, Figura 1).

Existen algunas diferencias anatómicas entre las mencionadas células que están organizadas en dos cilindros concéntricos, denominándose a esta anatomía como Kranz (corona, Laetsch, 1974). En general, las hojas de estas especies muestran extensiva vascularización, las CVV centrales rodean cada vaina vascular y las CM rodean a este anillo central. Las CVV están

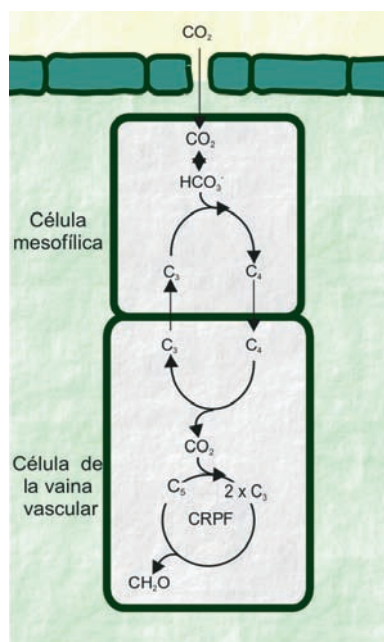


FIGURA 1. Esquema simplificado de la fotosíntesis  $C_4$ . Mecanismo de concentración de  $CO_2$  en donde las células mesofílicas y de la vaina vascular cooperan para fijar  $CO_2$ .  $C_4$ , ácido orgánico de cuatro átomos de carbono;  $C_3$ , ácido orgánico de tres átomos de carbono;  $C_5$ , ribulosa-1,5-bisfosfato; CRPF, Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato.

( $C_4$ ) que es transportado a las CVV donde es decarboxilado para generar el  $CO_2$  que es fijado, posteriormente, por la RuBisCO en el CRPF. La reacción de decarboxilación también da lugar a la formación de un ácido orgánico de tres átomos de carbono ( $C_3$ ), que retorna a las CM para regenerar el PEP en la reacción catalizada por la piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK, Hatch, 1987, Figura 1). La PEPC, a diferencia de la RuBisCO, no reacciona con el  $CO_2$  ni con el  $O_2$  y la anhidrasa carbónica (AC) en el citosol de las CM provee a la enzima de  $HCO_3^-$ .

Existen variaciones en el metabolismo  $C_4$  según las enzimas decarboxilantes y los metabolitos transportados; así, el proceso de decarboxilación ocurre de tres maneras diferentes, usando principalmente una de las siguientes enzimas: EM-NADP, EM-NAD o PEP-CK (Hatch y Osmond, 1976). El esquema de la Figura 2 muestra los eventos bioquímicos actualmente aceptados para los tres mecanismos  $C_4$ .

separadas de las CM y del aire de los espacios intercelulares por una lamela que es altamente resistente a la difusión del  $CO_2$  y del  $O_2$ . Además, la pérdida de  $CO_2$  está limitada debido a la mínima exposición de la superficie celular al espacio intercelular. La difusión simplástica de metabolitos está favorecida por los numerosos plasmodesmos que comunican a las CM con las CVV (Edwards y Huber, 1981).

El metabolismo  $C_4$  o vía de Hatch-Slack se caracteriza por la separación espacial de los procesos de carboxilación y decarboxilación. Básicamente, en una primera etapa la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en el citosol de las CM produce un ácido orgánico de cuatro átomos de carbono

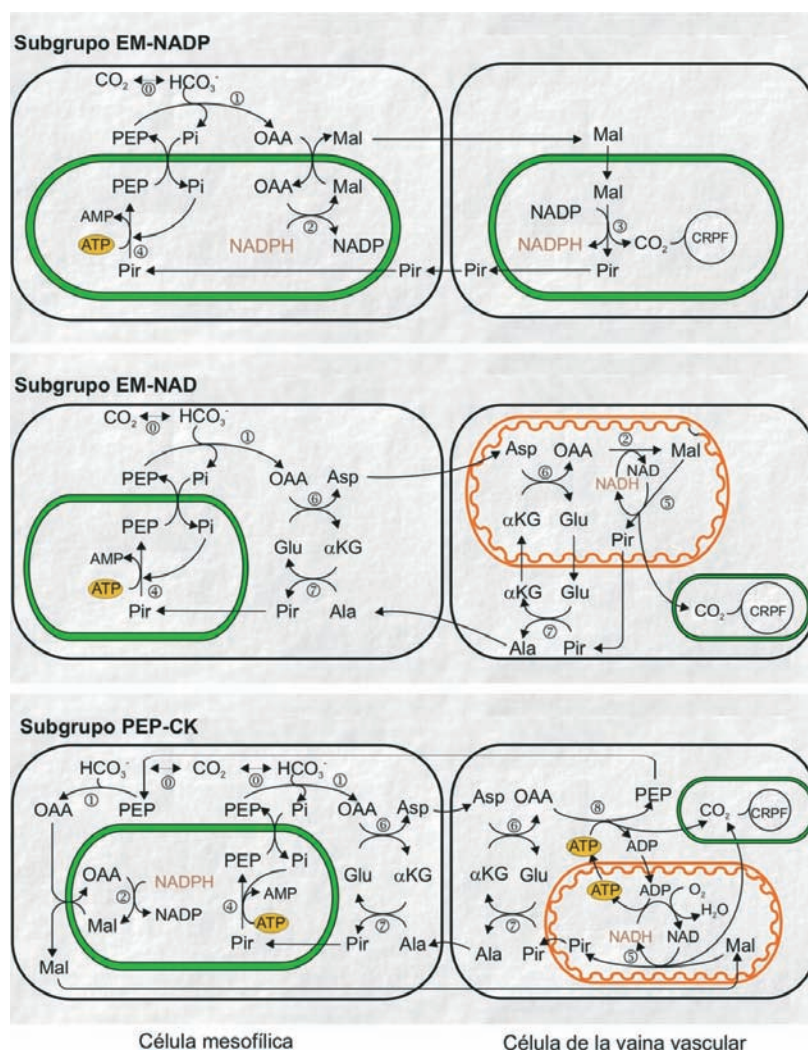


FIGURA 2. Representación esquemática del metabolismo de fijación de carbono en los diferentes subgrupos de plantas  $C_4$ . Los números indican las enzimas involucradas: 0, anhidrasa carbónica; 1, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2, malato deshidrogenasa-NADP; 3, enzima málica-NADP; 4, piruvato ortofosfato diquinasa; 5, enzima málica-NAD; 6, aspartato aminotransferasa; 7, alanina aminotransferasa; 8, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Abreviaturas:  $\alpha$ KG,  $\alpha$ -cetoglutarato; CRPF, Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato; Pir, piruvato; Mal, malato.

## Regulación del ciclo $C_4$

A la separación física de los eventos de carboxilación y decarboxilación subyace una estricta regulación del metabolismo fotosintético. De esta forma, la regulación de la fijación del carbono es más compleja en las plantas  $C_4$  que en las  $C_3$ , y debe asegurarse la provisión de  $CO_2$  al CRPF. Si bien la mayoría de los mecanismos regulatorios de las diferentes enzimas son similares a los de las enzimas encontradas en plantas  $C_3$ , mecanismos de control adicionales han sido descriptos, confiriéndoles a las enzimas que participan en este ciclo propiedades únicas (Leegood, 1997). La PEPC constituye un punto principal en el diálogo entre los dos tipos de células fotosintéticas: la enzima es regulada por triosas-P y hexosas fosfato (hexosas-P). De esta manera, cuando ocurre una activa fijación de  $CO_2$  a través del CRPF, los niveles de estos metabolitos aumentan activando a la enzima. Así, la PEPC regula el envío de  $CO_2$  a la RuBisCO. Por el contrario, cuando la velocidad de CRPF disminuye, debido a la insuficiente disponibilidad de energía y de poder reductor, los metabolitos transportados, L-malato y aspartato, se acumulan e inhiben a la PEPC, disminuyendo la fijación del  $CO_2$  y, en consecuencia, disminuyendo también los niveles de los activadores de la PEPC, triosas-P y hexosas-P (Bailey *et al.*, 2000).

En numerosos casos, las actividades enzimáticas varían frente a los cambios de luz en diferentes formas: la malato deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP) es regulada por óxido-reducción por medio del sistema de la Ferredoxina-Tiorredoxina,

mientras que la PEPC y la PPDK son reguladas por fosforilación. En plantas  $C_4$ , la PEPC que participa en la fotosíntesis durante el día es activada por una PEPC quinasa (PEPC-K) siendo así menos susceptible a la inhibición por el malato (Jiao y Chollet, 1988). Por el contrario, la defosforilación de la PPDK inactiva, por medio de una proteína regulatoria, conduciría a su forma más activa.

## Metabolismo Ácido de las Crasuláceas

El Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM, del idioma Inglés) es un mecanismo fotosintético de concentración de  $CO_2$  en donde las células fotosintéticas incorporan  $CO_2$  durante la noche y lo asimilan en forma de carbohidratos durante el siguiente período de luz. Este metabolismo implica la separación temporal de la fijación primaria del  $CO_2$  en forma de ácidos  $C_4$  (usualmente malato) de su asimilación por medio de la RuBisCO, y su posterior incorporación secundaria del carbono en forma de carbohidratos (Figura 3).

Las reacciones bioquímicas que operan en el metabolismo CAM tienen lugar en un sólo tipo de célula fotosintética, en contraste con la separación espacial que se encuentra en las plantas con fotosíntesis  $C_4$ . Además, el CAM está correlacionado con varias características anatómicas o morfológicas que minimizan la pérdida de agua, entre ellas la presencia de cutículas gruesas, baja relación superficie:volumen, reducido tamaño y/o frecuencia estomática, y succulencia (gran tamaño celular con prominente vacuola central). Mu-

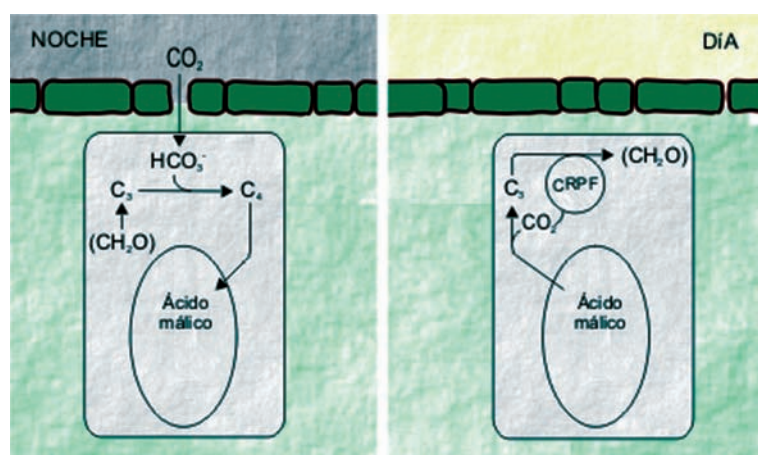


FIGURA 3. Representación esquemática de la fijación del carbono en plantas CAM.  $C_3$ , ácido orgánico de 3 átomos de carbono;  $C_4$ , ácido orgánico de 4 átomos de carbono; CRPF, Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato.

chas de estas plantas contienen gran cantidad de tejido mesofílico no fotosintético o abundantes células, como las células de reserva de agua, que contribuyen a la supervivencia en períodos de sequía prolongados (Cushman y Bohnert, 1997).

En las plantas CAM el patrón de consumo de  $\text{CO}_2$ , la síntesis de ácidos orgánicos y la formación de carbohidratos, permiten dividir al período de veinticuatro horas en cuatro etapas (Osmond, 1978). La primera fase tiene lugar durante la noche en donde el  $\text{CO}_2$  atmosférico y el  $\text{CO}_2$  producido por la respiración mitocondrial son incorporados por la enzima PEPC en forma de OAA. Los estomas se encuentran abiertos permitiendo el intercambio gaseoso, y la enzima RuBisCO se encuentra inactiva. Se acumula ácido málico en la vacuola, y las reservas de carbohidratos proveen el sustrato de la PEPC, el PEP. Durante la segunda fase, al inicio del siguiente período de luz, tanto la PEPC como la RuBisCO se encuentran en sus formas activas y el malato es liberado de la vacuola. Es decir, transcurren simultáneamente la fijación del  $\text{CO}_2$  proveniente del malato y la del  $\text{CO}_2$  atmosférico. El tercer período ocurre durante la mayor parte del día, los estomas permanecen cerrados y la decarboxilación del malato provee el  $\text{CO}_2$  que es fijado por la RuBisCO. De esta manera, aumenta la concentración del  $\text{CO}_2$  en el sitio de la RuBisCO, suprimiendo así la actividad oxigenasa de la enzima y, en consecuencia, minimizando la fotorrespiración. Durante este período, el CRPF incorpora el  $\text{CO}_2$  en triosas-P y se produce la acumulación de carbohidratos típica de cada tipo de planta CAM. Finalmente, en la cuarta fase, al final del período de luz, las reservas de malato se agotan causando una disminución en la concentración intracelular de  $\text{CO}_2$  y en la velocidad de fijación por el CRPF. Esto resulta en la apertura de los estomas y en la asimilación del  $\text{CO}_2$  atmosférico dando lugar a un nuevo ciclo.

De esta forma, la fotosíntesis CAM es definida como un consumo neto de  $\text{CO}_2$  que ocurre principalmente durante la noche, el cual es acompañado con fluctuaciones diarias en las concentraciones de ácidos orgánicos. En consecuencia, se ha aceptado la ocurrencia de una o más de las siguientes características como indicativas de metabolismo CAM (Ting, 1985): fijación nocturna de  $\text{CO}_2$ , fluctuación diaria recíproca de carbohidratos de reserva, fluctuación diurna de ácidos orgánicos, grandes vacuolas (la vacuola puede ocupar más del 95% del volumen celular), algún grado de

suculencia en las hojas o vástagos, altos niveles de PEPC y de enzimas decarboxilantes.

### Vía bioquímica operante en el metabolismo CAM

La carboxilación del PEP proveniente de la glicólisis, catalizada por la enzima PEPC, produce la fijación nocturna del  $\text{CO}_2$  atmosférico en OAA. Este ácido orgánico  $\text{C}_4$ , por medio de la MDH-NAD(P), es reducido a malato el cual es transitoriamente almacenado en la vacuola central en forma de ácido málico, proporcionando el gradiente de concentración necesario para sostener el transporte y evitando el descenso brusco del pH citosólico que inhibiría a la PEPC. Durante el día se produce la alcalinización citosólica, como consecuencia de la etapa luminosa de la fotosíntesis, inactivando la bomba de  $\text{H}^+$  a la cual está acoplada el ingreso de malato a la vacuola (Ellebracht *et al.*, 1994). Así, el malato es liberado de la vacuola en forma pasiva y es sometido a la acción de las enzimas decarboxilantes. El  $\text{CO}_2$  resultante es fijado en forma definitiva por la RuBisCO en el CRPF. Como producto de la decarboxilación se produce un compuesto de tres átomos de carbono que es derivado a la vía gluconeogénica para generar carbohidratos de reserva o bien es utilizado como fuente de energía para la respiración celular.

En forma análoga a las especies  $\text{C}_4$ , las plantas CAM pueden clasificarse en dos grupos mayoritarios según el tipo de enzima decarboxilante que poseen: especies tipo EM-NAD(P) y especies tipo PEP-CK. En el primer grupo, el malato es decarboxilado por la EM-NAD mitocondrial y/o por la EM-NADP citosólica, generando  $\text{CO}_2$ , el cual es fijado por la RuBisCO. El piruvato generado requiere la actividad PPDK cloroplástica para recuperar gluconeogénicamente el PEP. En el segundo grupo, el malato es convertido a OAA por la MDH-NAD(P) el cual es, posteriormente, decarboxilado produciendo  $\text{CO}_2$  y PEP en el citosol. Este último grupo de especies muestran bajos niveles de actividad EM-NAD(P) y carecen completamente de actividad PPDK (Winter y Smith, 1996).

### Plasticidad del metabolismo CAM

Factores ontogénicos, genotípicos y ambientales, como intensidad de luz, humedad relativa y disponibi-

lidad de agua, se combinan para gobernar el grado en el cual los atributos bioquímicos y fisiológicos del CAM son expresados (Cushman y Borland, 2002). De esta manera, según las influencias ambientales y/o del desarrollo, una variedad de características de asimilación de  $\text{CO}_2$ , de flujo de ácidos orgánicos y de comportamiento estomático se ha observado más allá del patrón convencional de las cuatro fases del CAM. Así, las especies que presentan el llamado metabolismo *CAM-cycling* exhiben incorporación de  $\text{CO}_2$  durante el día (como en la fotosíntesis  $\text{C}_3$ ), pero acompañada de refijación en ácidos orgánicos del  $\text{CO}_2$  respirado durante la noche (Cushman y Bohnert, 1997). Esta recaptura nocturna del  $\text{CO}_2$  contribuye a mantener el balance positivo de carbono durante los frecuentes episodios de estrés hídrico (Martin, 1996). Este proceso es considerado un preludio para pasar a un metabolismo CAM activo a partir de la fotosíntesis  $\text{C}_3$ . Otras especies exhiben el denominado metabolismo *CAM-idling*, en el cual los estomas permanecen cerrados durante la noche y el día, y la refijación del  $\text{CO}_2$  respirado durante la noche conduce a la fluctuación diaria de ácidos orgánicos aunque no se produzca intercambio gaseoso con el medio. Es decir, la segunda y cuarta fase quedan suprimidas. Este comportamiento contribuye al mantenimiento del aparato fotosintético bajo condiciones de estrés hídrico severo y permite la rápida recuperación luego de la rehidratación (Cushman y Bohnert, 1997).

Las plantas CAM pueden clasificarse también en *CAM obligadas* o *constitutivas*, las cuales exhiben dicho metabolismo independientemente de cualquier factor interno o externo, y en especies *CAM facultativas* o *inducibles*, en las que el CAM se presenta como resultado de condiciones ambientales particulares o del desarrollo.

*Mesembryanthemum crystallinum* es una especie  $\text{C}_3$  modelo en la cual el CAM se induce en respuesta a estrés hídrico, osmótico y salino, alta luz, por exposición de las raíces a bajas temperatura o anoxia, o por tratamiento con ácido abscísico (Chu *et al.*, 1990; Herppich *et al.*, 1992; Taybi *et al.*, 2002). El cambio de fotosíntesis  $\text{C}_3$  a CAM usualmente está acompañado por profundos cambios en la morfología, fisiología, bioquímica y expresión génica que posibilitan el establecimiento de nuevas funciones metabólicas. Morfológicamente, se observa un incremento en la turgencia de la hoja, así como un aumento del tamaño y turgencia de las células epidérmicas que acumulan sal. Se sintetizan compuestos osmorreguladores y estabilizadores de

la conformación nativa de las proteínas, como la prolina y el pinitol (Hasyashi y Murata, 1998). A su vez, se produce un aumento de hasta 40 veces en la actividad de las enzimas PEPC, EM-NAD(P), PPDK y otras enzimas involucradas en la glicólisis y la gluconeogénesis (Edwards *et al.*, 1996). Como consecuencia de la distribución del flujo de carbono se producen modificaciones en la partición del carbono, y en el transporte de PEP, triosas-P y hexosas-P entre las organelas y el citosol. Así, hay un aumento en las actividades de los transportadores cloroplásticos Glc-6-P/ $\text{P}_i$  y PEP/ $\text{P}_i$  (Häusler *et al.*, 2000), y del transportador del tonoplasto  $\text{H}^+$ /ATPasa (Rockel *et al.*, 1998).

La transición del metabolismo está controlada, principalmente, a nivel transcripcional aumentando en forma coordinada la transcripción de genes que codifican para la isoforma específica del CAM de la PEPC (*ppc 1*) y de su quinasa (Ppck, Taybi y Cushman, 1999; Taybi *et al.*, 2000), junto con otros genes. Los transcritos de muchos de estos genes muestran fluctuaciones en su abundancia en forma circadiana (Dodd *et al.*, 2003; Kore-eda *et al.*, 2004). La cascada de transducción de la señal requeriría de calcio y de actividades de proteínas quinasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes (Golldack y Dietz, 2001). Varios mecanismos postraduccionales gobernarían las respuestas a corto plazo como la modulación de la traducción, la degradación de proteínas y la actividad enzimática en sincronía con el patrón periódico del CAM. El aumento de la estabilidad del ARNm podría facilitar el mantenimiento del CAM durante los períodos de estrés, mientras que la desestabilización del mismo causaría su rápida disminución durante el alivio del estrés (DeRocher y Bohnert, 1993).

## Regulación del metabolismo CAM

En las plantas CAM, la PEPC es activa durante la noche e inactiva durante el día, lo cual es opuesto a lo encontrado en la PEPC de plantas  $\text{C}_4$ . De esta forma, la enzima es inhibida por malato durante el día cuando este compuesto se encuentra a altas concentraciones en el citosol debido a su liberación desde la vacuola, evitando la refijación del  $\text{CO}_2$  proveniente de la decarboxilación del malato. Durante la noche, la enzima es insensible a este metabolito, lo que permite su acumulación. La regulación de la PEPC involucra procesos de fosforilación reversible. La actividad PEPC-K de plan-

tas CAM aumenta varias veces durante el período de oscuridad y disminuye antes del inicio del período de luz. Esta actividad es regulada en forma transcripcional, a través de un oscilador circadiano, e independientemente de las condiciones de iluminación (Nimmo *et al.*, 1987; Hartwell *et al.*, 1996; Taybi *et al.*, 2000). Por otra parte, en *M. crystallinum* se ha sido sugerido un control postraducciona para la PDK (Burnell y Hatch, 1985), a través de fosforilaciones reversibles.

El metabolismo CAM se caracteriza por presentarse como un ritmo circadiano endógeno, persistiendo aún en condiciones de oscuridad continua en presencia de aire libre de CO<sub>2</sub> o bajo iluminación constante en aire normal (Wilkins, 1960). El control circadiano de la abundancia de transcriptos de la PEPC-K podría ser, simplemente, una respuesta secundaria a factores como la fluctuación de la concentración del malato citosólico y a su transporte al tonoplasto. La respuesta a factores ambientales que alteran el contenido de ácidos orgánicos o la partición del malato entre el citosol y la vacuola, controlarían los ritmos circadianos sobre la actividad de PEPC-K, proporcionando un posible mecanismo para las rápidas alteraciones en la actividad de la PEPC observada en algunas especies CAM (Nimmo, 2000).

### Transición de metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> a metabolismo tipo CAM en especies del género *Portulaca*

En general, las hojas de una planta fijan el CO<sub>2</sub> a través de un único tipo de vía fotosintética. Sin embargo, como ha sido previamente mencionado, algunas plantas pueden cambiar su modo fotosintético bajo diversas circunstancias. Así, en la literatura se encuentran descritas numerosas transiciones entre los metabolismos C<sub>3</sub> y CAM, y algunos casos entre C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Contrariamente, a las transiciones previamente mencionadas, el cambio de fotosíntesis C<sub>4</sub> a CAM en familias que contienen especies tanto CAM como C<sub>4</sub> ha sido poco descrito, lo que hace de esta combinación un fenómeno interesante (Sage, 2002). Dicha transición solamente ha sido descrita en plantas suculentas C<sub>4</sub> pertenecientes al género *Portulaca* (*P. oleracea*, *P. grandiflora* y *P. mundula*) cuando son sometidas a condiciones de estrés hídrico o de fotoperíodos cortos (Lara y Andreo, 2005). El estudio de la transición de un tipo de metabolismo fotosintético a otro es de gran

interés ya que puede proveer información sobre la expresión y/o regulación diferencial de las enzimas involucradas en cada tipo de fotosíntesis, y probablemente involucre un cambio mayor en la regulación metabólica, debido a cambio en el patrón temporal de la adquisición de CO<sub>2</sub>.

### El caso de *P. oleracea*

Trabajos previos han clasificado a *P. oleracea* como una planta C<sub>4</sub>, a pesar de que el estado de desarrollo es uno de los factores más importantes en la determinación de la operación del tipo de fotosíntesis (Kennedy y Laetsch, 1973). De esta manera, se demostró que las hojas senescentes contenían grandes cantidades de enzimas pertenecientes a la fotosíntesis C<sub>3</sub> (Kennedy, 1976). Posee pequeñas hojas suculentas con anatomía Kranz y grandes células de reserva de agua (CRA). Posteriormente, se sugirió que podía cambiar su modo fotosintético de C<sub>4</sub> a CAM cuando era sometida a condición de sequía o fotoperíodos cortos (Koch y Kennedy, 1980, 1982; Kraybill y Martin, 1996). *P. oleracea* es encontrada en lugares tan variables como jardines y campos cultivados o como en zonas pobres en agricultura como los bordes de caminos y veredas que habitualmente se vuelven secos (Zimmerman, 1976). La variedad y la flexibilidad que muestra *P. oleracea* con respecto a sus hábitats sería un simple reflejo de la plasticidad que exhibe en cuanto a su metabolismo fotosintético. Dadas las similitudes bioquímicas entre las plantas CAM y C<sub>4</sub>, la transición entre estas dos vías no sería completamente sorprendente.

Para analizar esta posibilidad un grupo de plantas de *P. oleracea* fue crecido bajo condiciones de temperatura e intensidad lumínica controladas, un subgrupo de las mismas fue regado en forma regular (grupo control), y a otro se le suspendió el riego (grupo estresado). Una planta de cada grupo se muestra en la Figura 4, en donde se observa una pérdida del vigor de la planta y del color de las hojas con una disminución de la expansión de las mismas, como resultado del tratamiento. A pesar de las diferencias observadas, el suspendido del riego no causa la senescencia de las hojas de *P. oleracea*, las hojas pueden soportar la sequía por un período de más de un mes y luego recuperarse cuando son regadas nuevamente (Lara *et al.*, 2003).

Las plantas control presentaron una toma neta de CO<sub>2</sub> diurna de  $-720 \pm 200$  mmol CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> gpf<sup>-1</sup> y una

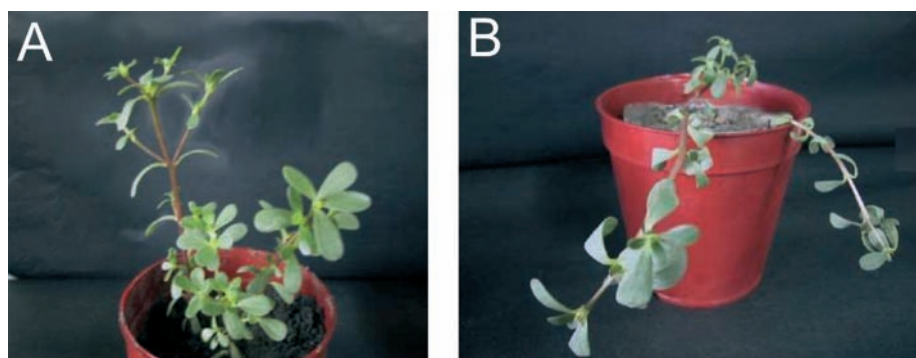


FIGURA 4. Fotografías de plantas de *P. oleracea*. En la figura A se muestra una planta regada regularmente y en la figura B se muestra un ejemplar a los 23 días de suspendido el riego.

liberación neta nocturna de  $130 \pm 50 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gpf}^{-1}$ . Las plantas estresadas presentaron este patrón de intercambio hasta aproximadamente 15 días luego de suspendido el riego y luego mostraron un aumento considerable de la fijación nocturna de  $\text{CO}_2$ , acompañado de una disminución notable de la asimilación de  $\text{CO}_2$  durante el día hasta exhibir una liberación de  $\text{CO}_2$  durante el período de luz a partir de los 21 o 23 días de suspendido el riego, utilizándose las plantas en estas condiciones para su posterior análisis (Lara *et al.*, 2003). Este patrón de intercambio gaseoso luego del tratamiento de las plantas es indicativo de un metabolismo CAM con limitada o nula fijación de  $\text{CO}_2$  durante el día y bajas velocidades de captura de  $\text{CO}_2$  en la oscuridad (Andrè *et al.*, 1979). La ausencia de una captura neta del  $\text{CO}_2$  atmosférico durante el día es una de las mayores diferencias encontradas con respecto a la inducción de un metabolismo del tipo CAM-cycling en diferentes especies del género *Talinum*, las cuales también pertenecen a la familia Portulacaceae (Harris y Martin, 1991). Además, se encontró un incremento de 7-8 veces en la fluctuación de la acidez titulable entre el período nocturno y el diurno en *P. oleracea* sometida a estrés con respecto a las plantas regadas normalmente. La misma se debe en parte al ácido málico cuya variación día-noche se incrementó de 0,1 en plantas controles a 9,1 mmoles  $\text{gpf}^{-1}$  en plantas estresadas. Estos parámetros indican que un metabolismo del tipo CAM se induce efectivamente en plantas de *P. oleracea* cuando a las mismas se les suspende el riego durante 21-23 días (Lara *et al.*, 2003). Así, puede sugerirse que el reciclado del  $\text{CO}_2$  liberado por la respiración, luego del tratamiento de estrés podría ser responsable de la síntesis nocturna de ácido málico. Además, considerando el  $\text{CO}_2$  liberado por la respiración, la fijación nocturna

durante el período de estrés hídrico representa un importante porcentaje de aquella durante el día en plantas controles. De esta manera, este nivel de fijación podría contribuir al mantenimiento de la biomasa en las plantas estresadas. Una evidencia extra de un metabolismo fotosintético activo en el tejido bajo condiciones de estrés lo suministra el hecho de que se produce una acumulación del almidón en las CVV aún durante la suspensión del riego.

La especie *P. oleracea* contiene hojas suculentas que presentan una venación reticulada. Se puede distinguir el parénquima en empalizada con células alargadas perpendiculares a la epidermis, ubicadas principalmente en la cara superior (adaxial), y el parénquima esponjoso localizado en la cara inferior o abaxial (Figura 5A). Además, se caracteriza por poseer la anatomía Kranz con CVV y CM. Mientras que los cloroplastos de las primeras se localizan en posición centrípeta, hacia el tejido vascular, como es característico de las plantas  $\text{C}_4$  subtipo EM-NAD, los cloroplastos de las CM se distribuyen uniformemente dentro del citosol celular (Figura 5B).

Por otra parte, entre la epidermis y el parénquima se puede detectar el tejido acuoso constituido por células de reserva de agua (CRA) de gran tamaño que contienen escasos cloroplastos (Lara *et al.*, 2003). Las CRA han sido previamente descritas en otras especies  $\text{C}_4$ . Así, en la familia Salsoleae el tejido acuoso puede comprender hasta el 40% del volumen de la hoja, siendo la ubicación del mismo similar a la encontrada en *P. oleracea* (Voznesenskaya *et al.*, 1999). Luego de 21-23 días de suspendido el riego, los principales cambios observados incluyen la distorsión de las CM y el desplazamiento de sus cloroplastos, hacia las CVV, es decir en posición centrípeta, en muestras tomadas tanto en el día

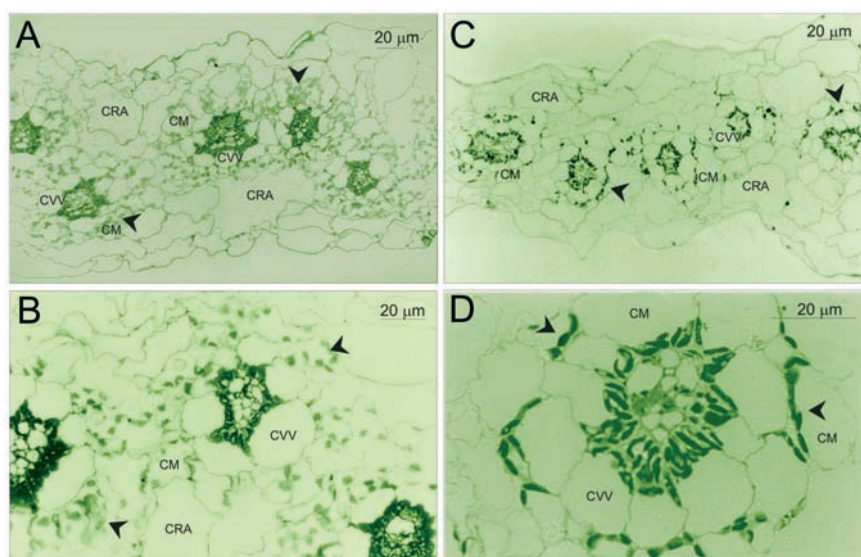


FIGURA 5. Anatomía de la hoja de *P. oleracea* control (A y B) y luego de 21-23 días de estrés hídrico (C y D) con distintos aumentos, 20 X (A, C) y 100 X (B, D). Las flechas indican la localización de los cloroplastos mesofílicos. Abreviaturas: CRA, células de reserva de agua; CM: células mesofílicas; CVV, células de la vaina vascular. Figura tomada de Lara *et al.*, 2003.

como durante la noche (Figura 5D). Además, se observó una pérdida general en el número de cloroplastos en todo el tejido. Estos cambios son acompañados por un colapso parcial de las CRA y de una pérdida de la organización de este tejido (Figuras 5C y D). A pesar de que el contenido relativo de agua no es tan alto en plantas controles ( $82,0 \pm 1,3\%$ ) como el informado para otras plantas  $C_4$  ( $90-95\%$ , Lal y Edwards, 1996), la pérdida en el contenido de agua ( $59,2 \pm 8,8\%$ , luego de 21-23 días de suspendido el riego) es suficiente para ocasionar un cambio en la estructura de la hoja de *P. oleracea* (Lara *et al.*, 2003). Probablemente una de las funciones del tejido acuoso sea la transferencia de agua a las CM y a las CVV en los momentos de estrés. En forma similar, un estudio en cactus ha mostrado que el tejido de reserva de agua transfiere agua al clorénquima para ayudar al mantenimiento de la actividad fotosintética (Guralnick *et al.*, 2002). De esta manera, a pesar de que no es sabido si el tratamiento aplicado afecta en forma directa la localización de los cloroplastos o si existe algún tipo de señal bioquímica que desencadene este tipo de respuesta, la nueva localización de estas organelas debe estar relacionada, o ser necesaria, para el funcionamiento del metabolismo del tipo CAM que se induce en las plantas del género *Portulaca*.

El estudio de varias enzimas del metabolismo del carbono incluyendo actividad, propiedades regulato-

rias, nivel de proteína proteína inmunoreactiva e inmunolocalización *in situ*, junto con lo previamente expuesto permite plantear los siguientes modelos metabólicos para la fijación del carbono en plantas controles y sometidas a estrés por eliminación del riego durante 21-23 días.

Durante los períodos con suficiente disponibilidad de agua, las CM y las CVV cooperarían para fijar el  $CO_2$  bajo un modelo tradicional  $C_4$ , siendo la EM-NAD la principal enzima decarboxilante involucrada en la liberación del  $CO_2$  en las CVV, y una isoforma de la PPDK, probablemente de localización cloroplástica, actuaría en las CM para regenerar al PEP (Figura 6). Este modelo es sustentado por la localización específica de las enzimas RuBisCO en cloroplastos de las CVV, de la EM-NAD en mitocondrias de las mismas células y de la PEPC en el citosol de las CM, como así también por los niveles de actividad de enzimas  $C_4$ , los patrones de acumulación de almidón y fundamentalmente por las características cinéticas y propiedades regulatorias de la PEPC, típicas de PEPC- $C_4$  como ser fosforilación diurna que ocasiona una menor sensibilidad de la enzima a la inhibición por L-malato durante el día. Los patrones de intercambio de  $CO_2$  y la ausencia de acumulación de malato durante la noche también confirman esta hipótesis. Adicionalmente, debido a la presencia de la PEPC en las CRA, éstas podrían

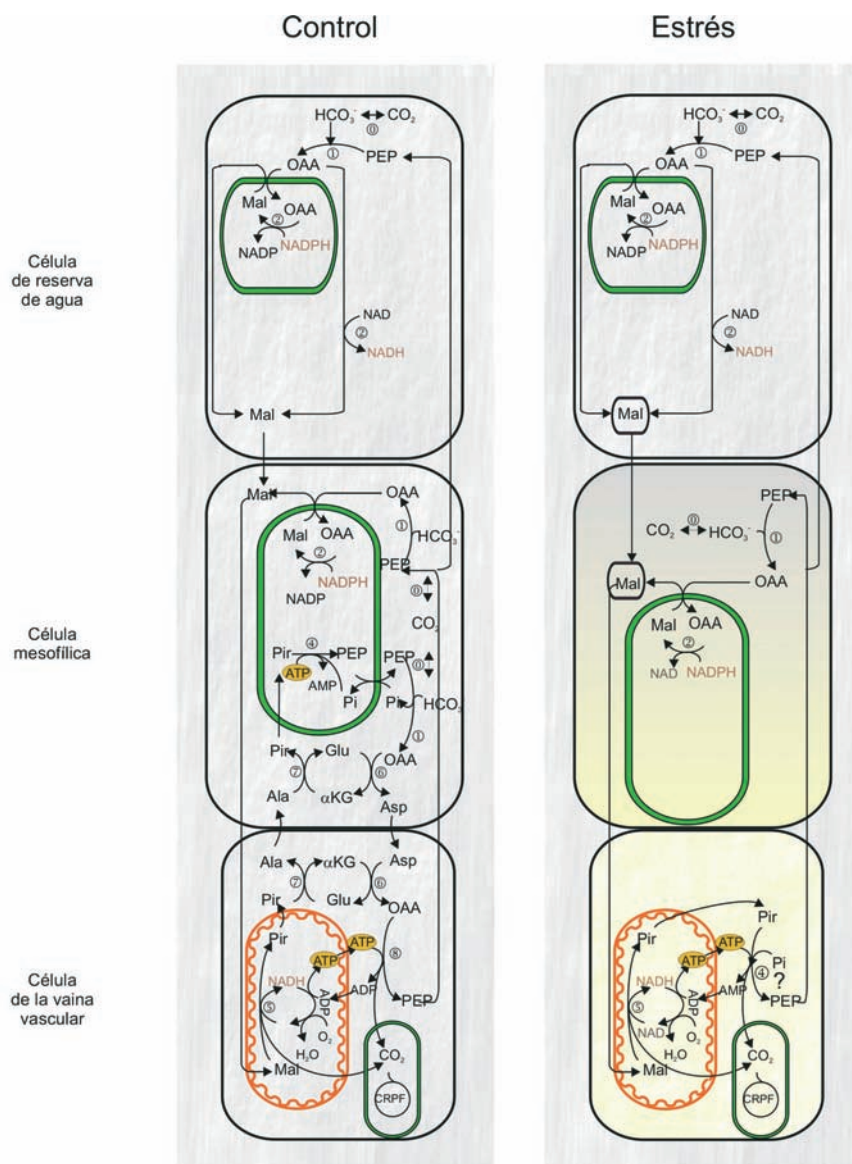


FIGURA 6. Modelo propuesto para la fijación del CO<sub>2</sub> en plantas de *P. oleracea* regadas periódicamente (Control) y luego de 21-23 días de suspendido el riego (Estrés). Control: Separación espacial de la fijación de carbono diurna. Estrés: Separación espacial y temporal de la asimilación del carbono. Durante la noche se produce la fijación primaria del CO<sub>2</sub> por la fosfoenolpiruvato carboxilasa. El malato es transitoriamente acumulado en la vacuola. En el siguiente período de luz el CO<sub>2</sub> es liberado para su fijación por el CRPF. Los números indican las enzimas involucradas: 0, anhidrasa carbónica; 1, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2, malato deshidrogenasa-NAD(P); 4, piruvato ortofosfato diquinasa; 5, enzima málica-NAD; 6, aspartato aminotransferasa; 7, alanina aminotransferasa; 8, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Abreviaturas: αKG, α-cetoglutarato; CRPF, Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato; Pir, piruvato; Mal, malato. Figura modificada de Lara *et al.*, 2004.

contribuir con la fijación primaria del CO<sub>2</sub> produciendo OAA. Este compuesto podría ser transformado en malato por una MDH-NAD(P) en las mencionadas células y luego ser transportado a las CVV, a través de las CM, incorporándose al malato aportado por estas últimas (Lara *et al.*, 2003, 2004).

Durante los períodos de estrés hídrico se produciría una disminución generalizada del metabolismo fotosintético, indicado por una menor fijación neta del CO<sub>2</sub> y por una menor actividad y cantidad de alguna de las enzimas involucradas en la fotosíntesis como RuBisCO, PPDK, EM-NAD y PEPCase (Figura 6). En este caso, no sólo se produciría una separación espacial de la fijación primaria y secundaria del carbono, sino también temporal. Los patrones de intercambio gaseoso

con limitada o nula fijación de CO<sub>2</sub> durante el día (en algunas oportunidades se ha encontrado una pequeña liberación de CO<sub>2</sub>), junto con la acumulación de ácidos orgánicos en forma de malato durante la noche dan cuenta de esta separación temporal (Koch y Kennedy, 1980; Lara *et al.*, 2003). La localización diferencial de las enzimas RuBisCO, EM-NAD y PEPCase sugeriría que la incorporación del CO<sub>2</sub> por la PEPCase y la asimilación definitiva por la RuBisCO transcurren en células diferentes, al igual que en plantas con suministro de agua regular. Así, durante la noche el CO<sub>2</sub> sería fijado inicialmente por la PEPCase en el citosol de las CM en forma de OAA y almacenado en estas células como malato. En el siguiente período de luz, el malato sería transportado a las CVV donde la decarboxilación por medio en la

EM-NAD en las mitocondrias suministraría el  $\text{CO}_2$  a la RuBisCO. Probablemente una PPDK de localización citosólica y específica del CAM intervenga en la regeneración del PEP (Lara *et al.*, 2003, 2004). En cuanto a la PEPC de plantas sometidas a estrés, la misma presenta una menor actividad específica con mayor afinidad por el sustrato PEP y mayor sensibilidad a la inhibición por el L-malato, reflejando posibles variaciones en las concentraciones citosólicas del PEP, como así también diferentes velocidades de fijación del  $\text{CO}_2$  en ambas condiciones metabólicas. Además, en esta condición la fosforilación de la PEPC, demostrada por estudios de fosforilación *in vivo*, ocurriría durante la noche, en una manera opuesta a lo que ocurre en plantas con fotosíntesis  $\text{C}_4$  (Lara *et al.*, 2003). Además, el tratamiento de estrés tiene un importante efecto en la estructura de la hoja de *P. oleracea* con distorsión de las CM y desplazamiento de sus cloroplastos hacia las CVV, colapso parcial de las CRA y pérdida de la organización del tejido, que posiblemente sean consecuencia de la pérdida de agua. La contribución del tejido de reserva de agua a la fotosíntesis neta es incierta. Si bien las CRA se encuentran localizadas en forma contigua a la epidermis y la vía para la difusión del  $\text{CO}_2$  es más corta en estas células que para las CVV, los datos disponibles son todavía insuficientes como para asegurar una función en la fotosíntesis. La presencia de la RuBisCO en los cloroplastos luego del período de estrés es curiosa, ya que, con los estudios realizados, no se ha encontrado una enzima decarboxilante que libere el  $\text{CO}_2$  que posiblemente sea fijado por la PEPC en el citosol de esas células. Una hipótesis razonable es que estas células simplemente actúen como reservorio de agua para las CM y CVV, y que la ocurrencia de la PEPC y la RuBisCO en las CRA sea simplemente un resabio de un metabolismo CAM ancestral (Lara *et al.*, 2003, 2004).

### El caso de *P. grandiflora*

*P. grandiflora* ha sido clasificada como  $\text{C}_4$  según medidas de  $\delta^{13}\text{C}$  y estudios bioquímicos (Gutierrez *et al.*, 1974). Posee una anatomía Kranz inusual con varias capas de CRA ubicadas en el centro de la hoja cilíndrica suculenta (en forma opuesta a *P. oleracea* donde se encuentran contiguas a la epidermis, Ku *et al.*, 1981).

Bajo condiciones de estrés hídrico las hojas de *P. grandiflora* muestran actividad CAM-cycling mientras

que los tallos exhiben un metabolismo CAM-idling, teniendo estos últimos una función muy importante en el reciclado del carbón. En hojas no existe una ganancia o pérdida del  $\text{CO}_2$  durante la noche y se observa una disminución en la fijación neta del  $\text{CO}_2$  durante el día. Guralnick *et al.* (2002) propusieron que tanto el metabolismo  $\text{C}_4$  como el CAM operarían simultáneamente en hoja de plantas estresadas ya que la variación en la acidificación comienza cuando el período de luz se inicia y la toma de  $\text{CO}_2$  también; además, si bien se observa un colapso en las CRA, el tejido  $\text{C}_4$  está bien hidratado y funcionando. Al igual que en *P. oleracea*, los cloroplastos de las CM se encuentran agrupados luego del estrés. El rol de la capa más interna de las CRA es cuestionado debido a su distancia de las CM y a la escasa presencia de cloroplastos (Nishioka *et al.*, 1996). No obstante, alguna actividad podría existir en las CRA más externas ya que poseen RuBisCO y niveles de PEPC que se incrementan luego del estrés.

### Conclusiones finales

La familia Portulacaceae es relativamente pequeña (19 géneros y 425 especies), con una amplia distribución geográfica y distintas vías fotosintéticas,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ , CAM y CAM cycling. La mayoría de los miembros de esta familia poseen hojas que varían desde carnosas a hojas totalmente suculentas. Se ha propuesto que las especies de *Portulaca* constituyen una línea avanzada en la familia y que han derivado de ancestros CAM (Guralnick y Jackson, 2001). Durante la evolución de *Portulaca*, el metabolismo  $\text{C}_4$  pudo haberse desarrollado sobre el tejido preexistente CAM, y el metabolismo CAM se haya debilitado y relegado a una función menor, como por ejemplo en situaciones ambientales adversas (Sage, 2002). De esta manera, el desarrollo de un metabolismo tipo CAM, operante a través de la colaboración de las CM y las CVV, puede ser la consecuencia de la expresión de un remanente del CAM ancestral sobre la más evolucionada anatomía Kranz.

El metabolismo fotosintético operante en *P. oleracea* y en *P. grandiflora* demuestran la gran plasticidad inherente a los sistemas vegetales, y proveen ejemplos inusuales de finos controles de los procesos subcelulares que son llevados a cabo para lograr funciones bioquímicas muy complicadas. De esta manera, desde que la fotosíntesis  $\text{C}_4$  y CAM fueron descritas y los primeros estudios realizados, nuevas variantes han sido encontra-

das (Edwards *et al.*, 2004). Las mismas constituyen interesantes modelos que proveen la posibilidad de estudiar la ductibilidad de la fijación del carbono en función de las condiciones ambientales.

## Agradecimientos

Los autores son miembros de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico del CONICET y el trabajo de los mismos ha sido patrocinado por el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

## Referencias bibliográficas

- ANDRÉ, M.; THOMAS, D.A.; VON WILLERT, D.J. y GERBAUD, A., 1979. «Oxygen and carbon dioxide exchanges in crassulacean-acid-metabolism-plants». *Planta* 147, 141-144.
- ANDREWS, T. J. y LORIMER, G. H., 1987. «Rubisco: Structure, mechanism, and prospects for improvement». En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 10, 131-218. Ed. M.D. HATCH y N.K. BOARDMAN. Academic Press, San Diego (Estados Unidos).
- AP REES, T. (1984). «Sucrose metabolism». En: *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, 53-73. Ed. D.H. Lewis. Cambridge University Press. Cambridge (Inglaterra).
- BAILEY, K.S.; BATTISTELLI, A.; DEVER, L.V.; LEA, J. y LEEGOOD, R.C., 2000. «Control of C<sub>4</sub> photosynthesis: effects of reduced activities of PEPC on CO<sub>2</sub> assimilation in *Amaranthus edulis* L». *Journal of Experimental Botany* 51, 339-346.
- BURNELL, J. N. y HATCH, M. D., 1985. «Light-dark modulation of leaf pyruvate, Pi dikinase». *Trends in Biochemical Science* 10, 288-291.
- CHU, C.; DAI, Z.; KU, M.S.B. y EDWARDS, G.E., 1990. «Induction of CAM in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid». *Plant Physiology* 93, 1253-1260.
- CUSHMAN, J. y BOHNERT, H., 1997. «Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism». *Plant Physiology* 113, 667-676.
- CUSHMAN, J.C. y BORLAND, A.M., 2002. «Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation». *Plant Cell and Environment* 25, 295-310.
- DEROCHER, E.J. y BOHNERT, H.J., 1993. «Developmental and environmental stress employ different mechanisms in the expression of a plant gene family». *Plant Cell Reports* 19, 459-463.
- DODD, A.N.; GRIFFITHS, H.; TAYBI, T.; CUSHMAN, J.C. y BORLAND, A.M., 2003. «Integrating diel starch metabolism with the circadian and environmental regulation of CAM in *Mesembryanthemum crystallinum*». *Planta* 216, 789-797.
- EDWARDS, G. E. y HUBER, S. C., 1981. «The C<sub>4</sub> Pathway». En: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Vol. 8, 137-281. Eds. P.K. STUMPF y E.E. CONN. Academic Press, Nueva York (Estados Unidos).
- EDWARDS, G.E.; DAI, Z.; CHENG, S.H. y KU, M.S.B., 1996. «Factors affecting the induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*». En: *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecology and evolution. Ecological studies*, Vol 114, 119-134. Eds. K. WINTER y J.A.C. SMITH. Springer, Berlin Heidelberg, New York (Estados Unidos).
- EDWARDS, G.E.; FRANCESCHI, V.R. y VOZNESENSKAYA, E.V., 2004. «Single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm». *Annual Review of Plant Biology* 55, 173-196.
- ELLEBRACHT, A.; SONNEWALD, U. y HUBER, U., 1994. «Light stimulated proton transport into the vacuoles of leaf mesophyll cells does not require energization by the tonoplast pyrophosphatase». *Planta* 193, 203-204.
- GOLLDACK, D. y DIETZ, K.-J., 2001. «Salt induced expression of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific». *Plant Physiology* 125, 1643-1654.
- GURALNICK, L.J. y JACKSON, M.D., 2001. «The occurrence and phylogenetics of crassulacean acid metabolism in the Portulacaceae». *International Journal of Plant Sciences* 162, 257-262.
- GURALNICK, L.J.; EDWARDS, G.E.; KU, M.S.B.; HOCKEMA, B. y FRANCESCHI, V.R., 2002. «Photosynthetic and anatomical characteristics in the C<sub>4</sub>-crassulacean acid metabolism-cycling plant, *Portulaca grandiflora*». *Functional Plant Biology* 29, 763-773.
- GUTIÉRREZ, M.; GRACEN, V.E. y EDWARDS, G.E., 1974. «Biochemical and cytological relationships in C<sub>4</sub> plants». *Planta* 119, 279-300.
- HARRIS, E.S. y MARTIN, C.E., 1991. «Correlation between CAM-Cycling and photosynthetic gas exchange in five species of *Talinum* (Portulacaceae)». *Plant Physiology* 9, 1118-1124.
- HARTWELL, J.; SMITH, L.H.; WILKINS, M.B.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 1996. «Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is regulated at the level of translatable mRNA in response to light or a circadian rhythm». *The Plant Journal* 10, 1071-1078.
- HASHYASHI, H. y MURATA, N., 1998. «Genetically engineering enhancement of salt tolerance in higher plants». En: *Stress responses of photosynthetic organisms*, 133-148. Eds. K. SATOH y N. MURATA. Elsevier Science B.V. Amsterdam (Holanda).
- HATCH, M. D. y OSMOND, C. B., 1976. «Compartmentation and transport in C<sub>4</sub> photosynthesis». En: *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, Vol. 3, 144-184. Eds. C.R. STOCKING y U. HARBER. Springer-Verlag, New York (Estados Unidos).
- HATCH, M. D., 1987. «C<sub>4</sub> Photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure». *Biochemistry and Biophysics Acta* 895, 81-106.
- HÄUSLER, R.E.; BAUR, B.; SCHARTE, J.; TEICHMAN, T.; EICKS, M.; FISHER, K.L.; FLÜGGE, U.; WEBER, A. y FISHER, K., 2000. «Plastidic metabolite transporters and their physiological functions in the inducible CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*». *The Plant Journal* 24, 285-296.
- HERPPICH, W.; HERPPICH, M. y VON WILLERT, D.J., 1992. «The irreversible C<sub>3</sub> to CAM shift in the well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenic control». *Botanica Acta* 105, 34-40.
- JIAO, J. A. y CHOLLET, R., 1988. «Light/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 261, 409-417.
- KENNEDY, R.A., 1976. «Relationship between leaf development, carboxylase enzyme activities and photorespiration in the C<sub>4</sub> plant *Portulaca oleracea* L.». *Planta* 128, 149-154.

- KENNEDY, R.A. y LAESTCH, W.M., 1973. «Relationship between leaf development and primary photosynthetic products in the  $C_4$  plant *Portulaca oleracea*». *Planta* 115, 113-124.
- KOCH, K.E. y KENNEDY, R.A., 1982. «Crassulacean Acid Metabolism in the succulent  $C_4$  dicot, *Portulaca oleracea* L. under natural environmental conditions». *Plant Physiology* 69, 757-761.
- 1980. «Characteristics of Crassulacean Acid Metabolism in the succulent  $C_4$  Dicot, *Portulaca oleracea* L.». *Plant Physiology* 65, 193-197.
- KORE-EDA, S.; CUSHMAN, M.A.; AKSELROD, I.; BUFFORD, D.; FREDRICKSON, M.; CLARK, E. y CUSHMAN, J.C., 2004. «Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*». *Gene* 341, 83-92.
- KOZAKI, A. y TAKEBA, G., 1996. «Photorespiration protects  $C_3$  plants from photooxidation». *Nature* 384, 557-560.
- KRAYBILL, A.A. y MARTIN, C.E., 1996. «Crassulacean Acid Metabolism in three species of the  $C_4$  genus *Portulaca*». *International Journal of Plant Sciences* 157, 103-109.
- KU, S.; SHIE, Y.; REGER, B. y BLACK, C.C., 1981. «Photosynthetic characteristics of *Portulaca grandiflora*, a succulent  $C_4$  dicot». *Plant Physiology* 68, 1073-1080.
- LAETSCH, W. M., 1974. «The  $C_4$  syndrome: A structural analysis». *Annual Review of Plant Physiology* 25, 27-52.
- LAL, A. y EDWARDS, G.E., 1996. «Analysis of inhibition of photosynthesis under water stress in the  $C_4$  species *Amaranthus cruentus* and *Zea mays*: electron transport,  $CO_2$  fixation and carboxylation capacity». *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 403-412.
- LARA, M.V. y ANDREO, C.S., 2005. «Photosynthesis in non typical  $C_4$  species». En: *Handbook of Photosynthesis: Second Edition, Revised and Expanded*, 391-421. Ed. M. Pessarakli. CRC press, Taylor & Francis Group. New York (Estados Unidos).
- LARA, M.V.; DISANTE, K.B.; PODESTÁ, F.E.; ANDREO, C.S. y DRINCOVICH, M.F., 2003. «Induction of a Crassulacean Acid like Metabolism in the  $C_4$  succulent plant, *Portulaca oleracea* L.: physiological and morphological changes are accompanied by specific modifications in phosphoenolpyruvate carboxylase». *Photosynthesis Research* 77, 241-254.
- LARA, M.V.; DRINCOVICH, M.F. y ANDREO, C.S., 2004. «Induction of a Crassulacean Acid like Metabolism in the  $C_4$  succulent plant, *Portulaca oleracea* L.: study of enzymes involved in carbon fixation and carbohydrate metabolism». *Plant and Cell Physiology* 45, 618-626.
- LEEGOOD, R., 1997. «The regulation of  $C_4$  photosynthesis». *Advances in Botanical Research* 26, 251-316.
- LORIMER, G., 1981. «The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5 biphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration». *Annual Review of Plant Physiology* 32, 349-383.
- LORIMER, G. H. y ANDREWS, T. J., 1981. «The  $C_2$  chemo and photorespiratory carbon oxidation cycle». En: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Vol. 8, 329-374. Eds. P.K. STUMPF y E.E. CONN. Academic Press, Nueva York (Estados Unidos).
- MARTIN, C.E., 1996. «Putative causes y consecuencias of recycling  $CO_2$  via crassulacean acid metabolism». En: *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecology and evolution. Ecological studies*, Vol 114, 192-203. Eds. K. WINTER y J.A.C. SMITH. Springer, Berlin Heidelberg, New York (Estados Unidos).
- NIMMO, G.A.; WILKINGS, M.B.; FERWSON, C.A. y NIMMO, H.G., 1987. «Persistent circadian rhythms in the phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi* leaves and its sensitivity to inhibition by malate». *Planta* 170, 408-415.
- NIMMO, H.G., 2000. «The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants». *Trends in Plant Science* 2, 75-80.
- NIMMO, H.G.; FONTAINE, V.; HARTWELL, J.; JENKINS, G.I.; NIMMO, G.A. y WILKINS, M.B., 2001. «PEP carboxylase kinase is a novel protein kinase controlled at the level of expression». *New Phytologist* 151, 91-97.
- NISHIOKA, D.; MIYAKE, H. y TANIGUCHI, T., 1996. «Suppression of granal development and accumulation of Rubisco in different bundle sheath chloroplasts of the  $C_4$  succulent plant *Portulaca grandiflora*». *Annals of Botany* 77, 629-637.
- OGREN, W. L., 1984. «Photorespiration: pathways, regulation and modification». *Annual Review of Plant Physiology* 35, 415-442.
- OSMOND, C.B., 1978. «Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context». *Annual Review of Plant Physiology* 29, 379-414.
- ROBINSON, S. P. y WALKER, D. A., 1981. «Photosynthetic carbon reduction cycle». En: *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise*, Vol. 8, 193-236. P.K. STUMPF y E.E. CONN. Academic Press, Nueva York (Estados Unidos).
- ROCKEL, B.; LÜTTGE, U. y RATAJCZAK, R., 1998. «Changes in message amount of V-ATPase subunits during salt-stress induced  $C_3$ -CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum*». *Plant Physiology and Biochemistry* 36, 567-573.
- SAGE, R.F., 2002. «Are crassulacean acid metabolism and  $C_4$  photosynthesis incompatible?». *Functional Plant Biology* 29, 775-785.
- TAYBI, T. y CUSHMAN, J. C., 1999. «Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant». *Plant Physiology* 121, 545-555.
- TAYBI, T.; PATIL, S.; CHOLLET, R. y CUSHMAN, J.C., 2000. «A minimal serine/threonine protein kinase circadianly regulates phosphoenolpyruvate carboxylase activity in crassulacean acid metabolism-induced leaves of the common ice plant». *Plant Physiology* 123, 1471-1481.
- TING, I.P., 1985. «Crassulacean Acid Metabolism». *Annual Review of Plant Physiology* 36, 595-622.
- TOLBERT, N. E., 1997. «The  $C_2$  oxidative photosynthetic carbon cycle». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 1-25.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; PYANKOV, I.P. y EDWARDS, G.E., 1999. «Anatomy, chloroplast structure and compartmentalization of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsola (Chenopodiaceae)». *Journal of Experimental Botany* 50, 1779-1795.
- WILKINS, M.B., 1960. «An endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of *Bryophyllum*. II. The effects of light and darkness on the phase and period of the rhythm». *Journal of Experimental Botany* 11, 269-288.
- WINTER, K. y SMITH, J.A.C., 1996. Crassulacean acid metabolism current status and perspectives. En: *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecology and evolution. Ecological studies*, Vol 114, 416. Eds. K. WINTER y J.A.C. SMITH. Springer, Berlin Heidelberg New York (Estados Unidos).
- ZIMMERMAN, C.A., 1976. Growth characteristics of weediness in *Portulaca oleracea* L. *Ecology* 57, 964-974.



# Biotecnología de las plantas $C_4$ y expresión de sus genes

MARIAM SAHRAWY BARRAGÁN\*  
ANTONIO J. SERRATO RECIO\*  
y JUAN DE DIOS BARAJAS LÓPEZ\*

## Resumen

Numerosas plantas  $C_4$ , incluidas el maíz, *Flaveria*, amaranto, sorgo y un junco anfibio han sido utilizadas para elucidar el mecanismo molecular y las rutas de señalización que controlan la expresión génica de la fotosíntesis  $C_4$ . Algunas evidencias sugieren que genes que preexistían en plantas  $C_3$  fueron captados para el proceso  $C_4$  después de adquirir sorprendentemente diversos elementos reguladores. En este trabajo se revisa la creación de genes  $C_4$ , las actividades de los promotores de genes  $C_4$  cuya regulación depende de una combinación de potenciadores y silenciadores, el uso para la regulación transcripcional y postranscripcional de regiones 5' y 3' no transcritas y se analizan los factores de transcripción. Estos estudios han revelado nuevos aspectos acerca de mecanismos únicos o universales que describen la especificidad del tipo de células, la coordinación de las acciones núcleo-cloroplasto, las respuestas a hormonas, metabolitos, estrés y luz. Finalmente se analizan las posibles aplicaciones biotecnológicas para la obtención de plantas  $C_3$  con una fotosíntesis tipo  $C_4$  más eficiente.

## Summary

$C_4$  plants, including maize, *Flaveria*, amaranth, sorghum, and an amphibious sedge *Eleocharis vivipara*, have been employed to elucidate the molecular mechanisms and signalling pathways that control  $C_4$  photosynthesis gene expression. Current evidence suggests that pre-existing genes were recruited for the  $C_4$  pathway after acquiring potent and surprisingly diverse regulatory elements. This review emphasizes recent advances in our understanding of the creation  $C_4$  genes, the activities of their promoters consisting of synergistic and combinatorial enhancers and silencers, the use of 5' and 3' untranslated regions for transcriptional and post-transcriptional regulations, and the function of transcription factors. This study has revealed new insights into unique or universal mechanisms underlying cell-type specificity, coordinated nuclear-chloroplast actions, hormonal, metabolic, stress and light responses. Finally the possible biotechnological applications are considered for the creation of  $C_3$  plants with an efficient  $C_4$  photosynthesis.

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

## Introducción

La mayoría de las plantas terrestres, incluidas las pertenecientes a cultivos importantes como el arroz, trigo, soja y patata, se clasifican como plantas  $C_3$ , asimilan el  $CO_2$  atmosférico directamente a través de la ruta de la fotosíntesis  $C_3$  utilizando ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO ó RBC). Cuando la intensidad de luz y la temperatura son altas y las condiciones ambientales son áridas la Rubisco tiene una baja afinidad por el  $CO_2$  y es incapaz de distinguir el  $O_2$  del  $CO_2$  dando lugar a una baja capacidad fotosintética y un gasto de energía inútil debido a la fotorrespiración que se produce en plantas  $C_3$  (Edwards *et al.*, 1985; Edwards y Walter, 1983; Furbank y Taylor, 1995; Hatch, 1987, 1997; Ku *et al.*, 1996) (Figura 1). Las plantas  $C_4$ , tales como el maíz y la caña de azúcar evolucionaron a partir de las plantas  $C_3$  adquiriendo la ruta de fotosíntesis  $C_4$  que sirve de bomba de  $CO_2$  para conseguir una actividad fotosintética eficiente. Además, la adaptación a la luz intensa y a ambientes áridos y calurosos facilita un mayor aprovechamiento en el uso del agua y el nitrógeno (Black, 1973). La acción cooperativa de los dos tipos de procesos asimilatorios del  $CO_2$  existentes en las células del mesófilo y de la vaina, implica que este tipo de plantas pueden realizar una fotosíntesis muy eficiente, especialmente bajo condiciones que afectarían a las plantas  $C_3$ . Tanto las plantas  $C_4$  como CAM han evolucionado desde sus ancestros las especies  $C_3$  como respuesta a los cambios ambientales, hechos que provocaron una disminución de la disponibilidad de  $CO_2$ . El estudio de las bases moleculares de la fotosíntesis  $C_4$  ha aumentado nuestros conocimientos acerca de los procesos biológicos fundamentales y complejos y sobre todo ha aportado información útil en potenciales aplicaciones agrícolas. Así, desde que se descubrió la ruta  $C_4$  se ha postulado

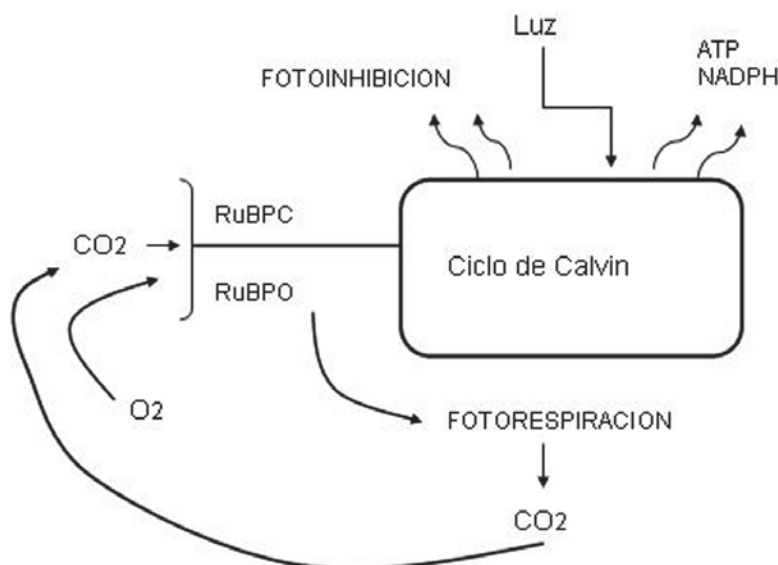


FIGURA 1. La ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBPC) y oxigenasa (RuBPO), es el cuello de botella de la fotosíntesis C<sub>3</sub>.

que la transferencia de características de plantas C<sub>4</sub> a C<sub>3</sub> mejoraría la fotosíntesis de las plantas C<sub>3</sub> y su uso en mejorar algunos cultivos.

Muchos progresos han sido realizados para poder entender las bases moleculares de la fotosíntesis C<sub>4</sub> mediante el empleo de varios sistemas modelos. La investigación en biología molecular de la fotosíntesis C<sub>4</sub> fue iniciada hace más de 20 años con el estudio de los genes cloroplásticos del maíz (Link *et al.*, 1978; Walbot 1977). Debido a que cada sistema ha evolucionado de forma independiente (Dengler *et al.*, 1985, Dengler y Nelson, 1998; Edwards *et al.*, 1985; Edwards y Walter, 1983; Ehleringer *et al.*, 1993; Hatch, 1987; Ku *et al.*, 1996; Sinha y Kellogg, 1996) estos estudios han dado lugar a una gran cantidad de información acerca de cómo las plantas utilizan distintos y creativos mecanismos moleculares para adquirir y regular nuevos genes.

Los primeros estudios fueron desarrollados para tratar de resolver la anatomía de las hojas, la fisiología y la bioquímica implicadas en los procesos C<sub>4</sub> y relacionar el desarrollo de las hojas con la expresión de los genes. Este último tema ha sido extensamente investigado (Edwards *et al.*, 1985, 1983; Furbank y Taylor, 1995; Hatch, 1987, 1997; Ku *et al.*, 1996; Dengler y Nelson, 1998; Dengler y Taylor, 1998; Langdale y Nelson, 1991; Nelson y Langdale, 1992) y varias revisiones han sido realizadas acerca de la fotosíntesis C<sub>4</sub> así como de la evolución de los genes implicados en la misma (Furbank y Taylor, 1995; Matsuoka, 1995;

Sugiyama, 1998). Estas revisiones analizan todas las contribuciones que han permitido obtener un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la evolución y regulación de los genes C<sub>4</sub>, y muestran los estudios más recientes en los que se utilizan plantas transgénicas, expresión transitoria y herramientas genéticas. Otros aspectos que se presentan son la coordinación núcleo-cloroplasto, la respuesta al estrés y a la luz UV, la transducción de señales y la regulación hormonal y metabólica.

## Expresión diferencial de los genes y fotosíntesis C<sub>4</sub>

### Genes implicados en la fotosíntesis C<sub>4</sub>

Las plantas C<sub>4</sub> pueden ser de distinto origen, sin embargo todas ellas poseen dos tipos de células fotosintéticas diferentes; las células del mesófilo (CM) y las células de la vaina (CV) que se encuentran en las hojas o tallo, estas son fisiológicamente y bioquímicamente diferentes (Dengler y Nelson, 1998; Dengler y Taylor 1998; Edwards *et al.*, 1985; Edwards y Walker, 1983; Furbank y Taylor, 1995; Hatch, 1987, 1997; Ku *et al.*, 1996; Langdale y Nelson, 1991; Nelson y Langdale, 1992; Sugiyama, 1998; Ueno O. 1998). La fijación del CO<sub>2</sub> se realiza en primer lugar en las células del mesófilo a través de la ruta del ciclo C<sub>4</sub>. Las enzimas anhidrasa carbónica (CA) y la fosfoenolpiruvato car-

boxilasa (PEPC) son las responsables de la hidratación y fijación del  $\text{CO}_2$  dando lugar al oxalacetato (OAA). Este proceso es muy eficiente además de insensible al  $\text{O}_2$ . El aceptor del  $\text{CO}_2$  es la PEP que es generado a partir del piruvato por la piruvato ortofosfatodikinasa (PPDK). El OAA es entonces convertido bien a malato por la NADP malato deshidrogenada (MDH) o bien a aspartato por la aspartato aminotransferasa (AST). Tanto la malato como el aspartato son transferidos a las células de la vaina donde el  $\text{CO}_2$  es liberado por la enzima NADP- o NAD-málico (ME) ó por PEP

carboxikinasa (PCK), y reasimilado por la rubisco a través del ciclo de Calvin en un ambiente enriquecido en  $\text{CO}_2$ , de esta manera se evita la fotorespiración (Figura 2) (Furbank y Taylor, 1995; Hatch, 1987, 1997; Hatch y Burnell, 1990; Ku *et al.*, 1996; Nelson y Langdale, 1992).

Varios genes nucleares que codifican las enzimas participantes en la ruta del ciclo  $C_4$  han sido aislados a partir del maíz, amaranto, *Flaveria*, sorgo y *Eleocharis vivipara* (Agarie *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 1997; Broglie *et al.*, 1984; Glackin y Grula, 1990; Hermans y Wes-

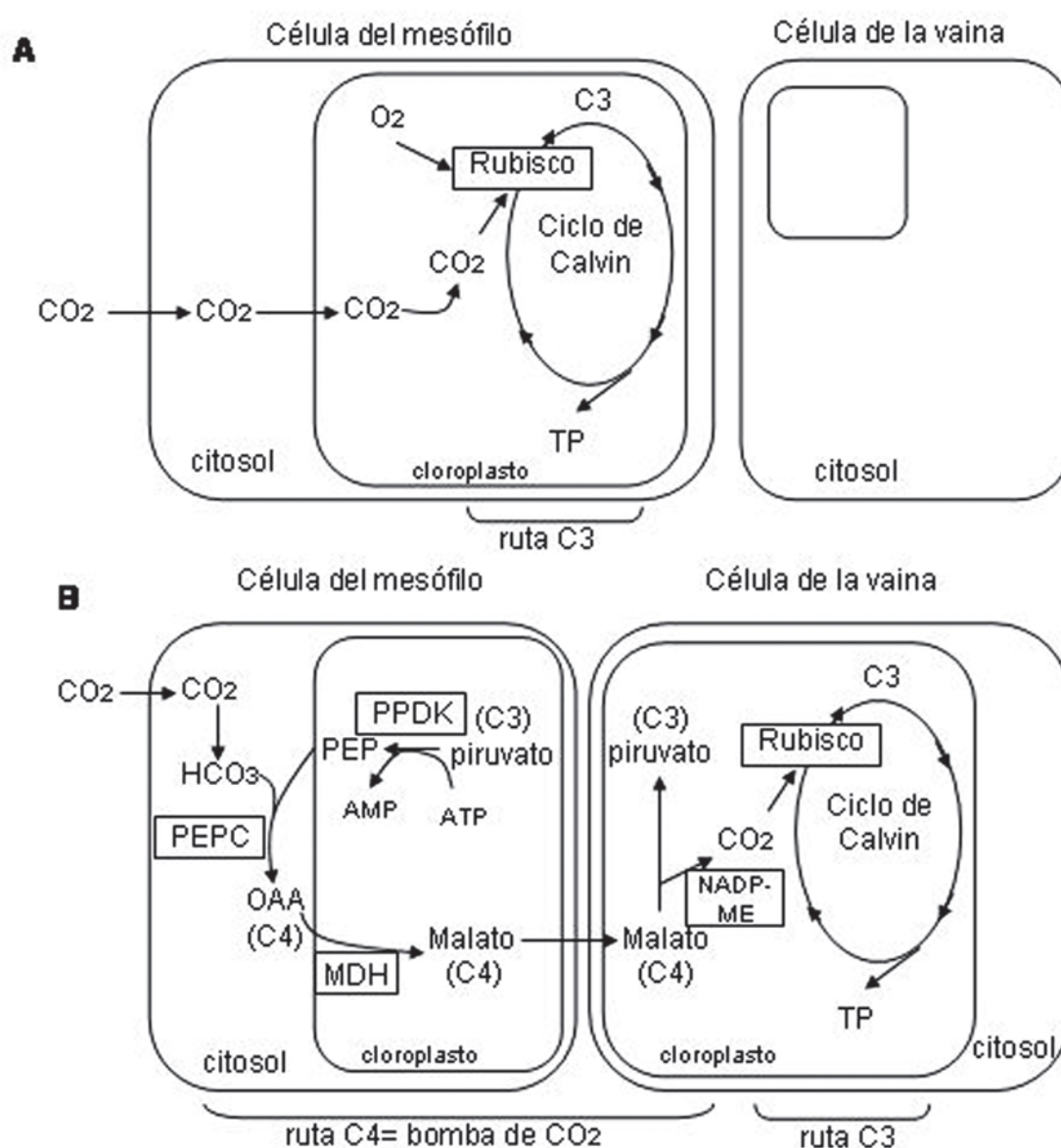


FIGURA 2. Ilustración simplificada de la ruta fotosintética  $C_3$  (A) y la ruta fotosintética  $C_4$  del tipo de plantas  $C_4$  NADP-ME (B). En la ruta  $C_4$ , una molécula de  $\text{CO}_2$  es transportada desde el citosol de la célula del mesófilo hacia el cloroplasto de la célula de la vaina donde se encuentra la Rubisco. Este proceso consume dos moléculas de ATP (una consumida por la PPDK y otra necesaria para la conversión del AMP a ATP).

thoff, 1990; Lepiniec *et al.*, 1993; Long y Berry, 1996; Luchetta *et al.*, 1990; McGonigle y Nelson, 1995; Sheen y Bogorad, 1987; Sugiyama, 1998; Westhoff *et al.*, 1997). Mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunolocalización junto con la purificación de células del mesófilo y de la vaina, se ha podido demostrar que estos genes  $C_4$  exhiben un patrón de expresión específico bien a las células del mesófilo ó de la vaina en hojas maduras de plantas  $C_4$  tanto a nivel de sus proteínas como de sus transcritos (Tabla 1). Asimismo, los genes nucleares que codifican las enzimas fotosintéticas conservadas y las proteínas implicadas en el ciclo de Calvin,

como el fotosistema II y el complejo fotolisis/oxidación del agua han podido ser identificados y muestran ser diferencialmente o preferencialmente expresados en células del mesófilo o de la vaina (Tabla 1) (Sheen y Bogorad, 1986; Wyrich *et al.*, 1998). Mediante experimentos de ensayo de transcripción nuclear interrumpida se ha observado que la expresión específica en células del mesófilo de hojas de maíz es regulada principalmente a nivel transcripcional, mientras que la expresión específica en las células de la vaina es probablemente controlada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Schäffner y Sheen, 1991).

TABLA 1  
Regulación de genes nucleares implicados en la fotosíntesis  $C_4$

Genes	Tipo de célula	Inducción	Represión	Especies
<i>C<sub>4</sub>Pdk</i>	M	L, N, UVA UVB	S, A, gly ABA	maíz sorgo, <i>E.v.</i>
<i>C<sub>4</sub>Ppc</i>	M	L, N	S, A	maíz, sorgo, <i>Ft.</i> , <i>A.h.</i>
<i>C<sub>4</sub>Mdh</i>	M	L	-	maíz, <i>Ft.</i> , sorgo
<i>C<sub>4</sub>Cah</i>	M	L, N	-	maíz, sorgo
<i>Cab</i>	M	L	S, A	maíz, sorgo
<i>PsbO</i>	M	L	-	maíz, sorgo
<i>PsbP</i>	M	L	-	maíz, sorgo
<i>PsbQ</i>	M	L	-	maíz, sorgo
<i>PsbR</i>	M	-	-	sorgo
<i>PsbS</i>	M	-	-	sorgo
<i>PsbT</i>	M	-	-	sorgo
<i>PsbW</i>	M	-	-	sorgo
<i>GapB</i>	M	-	-	sorgo
<i>PetF</i>	M	-	-	sorgo
<i>PetH</i>	M	-	-	sorgo
<i>Tpi</i>	M	-	-	sorgo
<i>RbcS</i>	V	L	S, A, ABA	maíz, <i>Ft.</i> , <i>A.h.</i>
<i>Pck</i>	V	-	-	maíz
<i>NADPMe</i>	V	L, UV-B	S, A	maíz, <i>Ft.</i> , sorgo
<i>NADMe</i>	V	L	-	A. h.
<i>Rca</i>	V	-	-	sorgo
<i>Prk</i>	V	-	-	sorgo
<i>FbaC</i>	V	-	-	sorgo
<i>TklC</i>	V	-	-	sorgo
<i>Rpe</i>	V	-	-	sorgo
<i>Omt</i>	V	-	-	sorgo

*Ft.*: *Flaveria trinervia*; *A.h.*: *Amaranthus hypochondriacus*. *E.v.* *Eleocharis vivipara*

M: mesófilo; V: vaina; L: luz roja y/o azul; N: nitrógeno; S: azúcares;

A: acetato; gly: glicerol; ABA: ácido absicico.

Genes no encontrados en el texto.- **Psb**: fotosistema II; **GapB**: NADP-gliceraldehido-3P dehydrogenasa; **PetF**: ferredoxin; **PetH**: ferredoxin-NADP-oxidoreductasa; **Tpi**: triosafosfato isomerasa; **Rca**: rubisco activasa; **Prk**: fosforibulokinasa; **Fba**: fructosa-1, 6-bisfosfatasa aldolasa; **Tkl**: transketolasa; **Rpe**: ribulose-5P 3 epimerasa; **Omt**: 2-oxoglutarato/malato translocador.

### Expresión específica de otros genes en los distintos tipos de célula

Además de los genes fotosintéticos, la expresión de varios genes implicados en la asimilación del nitrógeno y del sulfato, del metabolismo de los amino ácidos, del transporte de los metabolitos y de la biosíntesis del almidón y de los azúcares también exhiben un patrón de expresión dependiente del tipo de célula en el que actúan (Burgener *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1996; Oaks, 1994). El ejemplo más sorprendente es la expresión específica en células del mesófilo de genes que codifican nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR) y otras enzimas cuya función está relacionada con la asimilación del nitrato (Sugiyama, 1998). Por otra parte, los genes que codifican la glutamina sintasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) y la glutamina sintasa (GS2) para la asimilación del amonio son preferencialmente inducidos por señales de nitrato en células del mesófilo pero no en células de la vaina. Es probable que la expresión diferencial de estos genes en las células del mesófilo pudiera ajustar la especialización fisiológica de cada tipo de célula para el metabolismo del nitrógeno. Un extensivo rastreo de genes de forma diferencial ha sido desarrollado en sorgo y maíz para identificar un gran número de genes que son expresados específicamente en células del mesófilo ó células de la vaina (Tabla 1). La secuenciación de estos genes ha permitido el descubrimiento de nuevos candidatos implicados en la fotosíntesis  $C_4$  (ej. Pck específico en CV de maíz) ampliando nuestro conocimiento acerca de las funciones fisiológicas y la regulación génica en las células del mesófilo y de la vaina (Wyrich *et al.*, 1998; T Furumoto & K Izui, comunicación personal).

### Desarrollo de la hoja y expresión diferencial de los genes

La mayoría de los genes  $C_4$  estudiados se expresan únicamente en hojas o en estructuras parecidas a las hojas y no en tallos o tejidos no fotosintéticos como las raíces. Con objeto de seguir el desarrollo de la hoja de maíz desde el primordio o callo regenerado hasta hojas maduras, se han utilizado anticuerpos y sondas de ADNc que codifican enzimas fotosintéticas como marcadores celulares específicos en las técnicas de hibridación *in situ* e inmunolocalización (Dengler y Taylor, 1998). La expresión de genes  $C_4$  muestran un patrón de

regulación temporal y espacial que se ajusta al estadio de desarrollo y a la ontogenia de las hojas. El análisis de los clones de las células fotosintéticas, células del mesófilo y células de la vaina de hojas de maíz sugiere que el desarrollo de las células del mesófilo depende más de su posición que del linaje. Sin embargo la capacidad fotosintética de las células del mesófilo o de la vaina está estrechamente relacionada con el desarrollo de los haces vasculares y está regulado por luz. La señal de la luz no solo aumenta la expresión de los genes  $C_4$  sino que también reduce la expresión de la subunidad grande y de la pequeña de la Rubisco (RbcS, RbcL) en células del mesófilo (Langdale *et al.*, 1988). Aún se desconocen las señales reguladoras generadas desde los haces vasculares para el control de la diferenciación de las células del mesófilo y de la vaina y del patrón de expresión de los genes  $C_4$ . Pero se ha podido demostrar que la regulación postranscripcional de NAD-ME de la dicotiledónea  $C_4$  *Amaranthus hypochondriacus* determina el inicio del patrón de expresión de genes  $C_4$  en cotiledones en desarrollo y en hojas (Berry *et al.* 1997). Los transcritos de *RbcS*, *RbcL*, fosfoenol piruvato carboxilasa (*Ppc*) y piruvato ortofofato dikinasa (*Pdk*) se acumulan en el meristemo apical y en el primordio de la hoja. Las proteínas de RBCL (subunidad grande de la Rubisco) y RBCS (subunidad pequeña de la Rubisco), pero no de las otras enzimas  $C_4$ , se detectan en tejidos en formación. La acumulación de las proteínas de enzimas  $C_4$  ocurre solo cuando el sistema vascular de la hoja empieza a diferenciarse (Ramsperger *et al.*, 1996). A diferencia del maíz, en la planta de amaranto la luz no es necesaria para la expresión celular específica de los genes de *RbcS* y *RbcL* y otros genes  $C_4$  (Wang *et al.*, 1993). En las hojas tri-color de *Amaranthus tricolor*, tanto la baja transcripción de los genes como la traducción de sus proteínas son responsables de la falta de capacidad fotosintética en las regiones rojas y amarillas de las hojas (McCormac *et al.*, 1997). Durante el desarrollo de los cotiledones de la dicotiledónea  $C_4$  *Flaveria trinervia*, la expresión de los genes  $C_4$  es dependiente de la luz y es similar a la expresión de los genes en la monocotiledónea maíz pero no en la dicotiledónea amaranto. Estas distintas regulaciones por la luz sugieren una evolución independiente de las diferentes plantas  $C_4$ . De los cuatro genes de *Ppck* de maíz, se ha observado que la expresión de *Ppck1* en hojas de maíz es específico del mesófilo y dependiente de la luz, indicando que codifica la PEPC kinasa que fosforila le PEPC durante la fotosíntesis  $C_4$ . Sorpren-

dentamente el gen *Ppck2* se expresa en células de la vaina preferentemente de noche. Esto sugiere que la función principal del producto del gen *Ppck2* es permitir que PEPC funcione anapleróticamente en las células de la vaina durante la noche sin interferir en el ciclo  $C_4$  (Shenton *et al.*, 2006).

### Evolución y regulación de los genes $C_4$

La mayoría de los genes  $C_4$  poseen genes ortólogos en plantas  $C_4$  y  $C_3$  que tienen expresión ubicua baja, sugiriendo que los genes  $C_4$  son el producto reciente de la duplicación de genes seguida de una alteración drástica de los elementos reguladores cis de la secuencia promotora lo que podría haber ajustado los cambios en la expresión de los genes así como en su localización para la fotosíntesis  $C_4$ . La falta de secuencias consenso entre las regiones reguladoras de los genes  $C_4$  indicarían una importante co-evolución de las diversas modificaciones genéticas, tales como mutaciones, cruces, inserciones y movilización de elementos. Las mutaciones

en las regiones codificantes cambian o eliminan la función de la proteína, mientras que las mutaciones en la región promotora en general causa la pérdida de expresión. Los mecanismos moleculares implicados en la evolución de los genes  $C_4$  han podido ser deducidos cuando se compararon con sus homólogos no-fotosintéticos en las mismas plantas  $C_4$  o con sus ortólogos en las plantas  $C_3$  estrechamente relacionadas.

### Genes *Pdk*

El maíz tiene tres isoformas diferentes de PPDK (piruvato ortofosfato dikinasa), la forma cloroplastídica implicada en la ruta  $C_4$  y dos formas citosólicas (Sheen, 1991). Las isoformas cloroplastídica y una de las citosólicas están codificadas por un gen único que tiene un sistema dual de promotor (Glackin y Grula, 1990; Sheen, 1991). El gen  $C_4$  *Pdk* de maíz comparte casi toda su secuencia codificante con el gen ancestro (*cyPdk1*) que codifica para la PPDK citosólica (Figura 3). Este gen (*Pdk1*) tiene dos sitios de iniciación de la

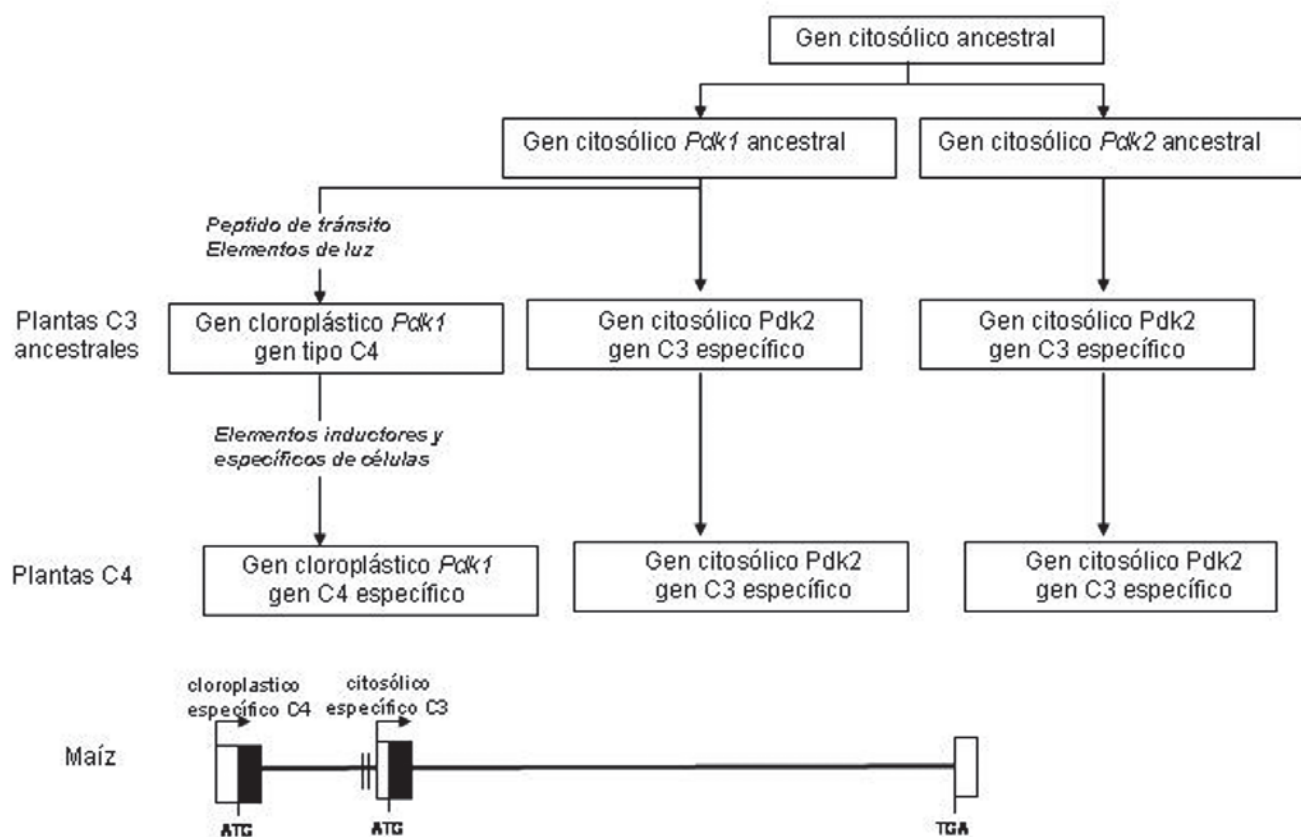


FIGURA 3. Representación esquemática de la evolución de los genes *Pdk1* y *Pdk2* de maíz que codifican PPDK. Los genes de *Pdk1* de plantas  $C_3$  y  $C_4$  tienen un sistema de promotor dual y codifican las isoformas cloroplastídica y citosólica, mientras que los genes *Pdk2* poseen un solo promotor y codifican la isoforma citosólica.

transcripción, cada uno regulado por diferentes promotores en sus respectivas regiones 5'. La transcripción en el primer sitio de iniciación genera un gran número de transcritos de la forma cloroplastídica, mientras que el segundo sitio produce pequeñas cantidades de transcritos de la isoforma citosólica. Los primeros se expresan específicamente en las células del mesófilo de hojas verdes y su expresión es inducida por luz, mientras que los pequeños transcritos se expresan en gran cantidad en raíz y en poca cantidad en las células del mesófilo (Sheen, 1991). La segunda isoforma citosólica es codificada por un solo gen bajo el control de un solo promotor (*Pdk2*), y muestra alta homología al gen *Pdk1* específico de  $C_3$ . Este último gen se expresa poco en las células del mesófilo (Sheen, 1991).

Un análisis comparativo entre los genes *Pdk* de maíz y de arroz en el que se postula su origen evolutivo se muestra en la Figura 3. A partir de un gen ancestro se originaron dos genes codificando la forma citosólica. Uno fue el ancestro del gen *Pdk2*, que evolucionaría para convertirse en el gen *Pdk2* de plantas  $C_3$  y  $C_4$ . El otro es un ancestro del gen *Pdk1* con un solo promotor. Este gen evolucionó para convertirse en el gen *Pdk1* con un sistema dual de promotores en una planta  $C_3$  ancestral, adquiriendo una secuencia para el péptido de tránsito, y finalmente evolucionar para convertirse en el gen *Pdk1* de plantas  $C_4$  y adquirir el mecanismo que permite una alta expresión del gen en este tipo de plantas.

Es posible que el escenario evolutivo del gen  $C_4$  *Pdk* en especies  $C_4$  de *Flaveria* difiera del que acabamos de describir. Si el gen *Pdk2* no existiera, la evolución en estas especies hubiera ocurrido probablemente sin duplicación del gen.

Las modificaciones de *Pdk1* necesarias para la evolución desde que empiezan a parecerse a un gen  $C_4$  hacia un gen específico  $C_4$  son relativamente simples, adquisición de elementos cis en la región promotora para la especificidad celular y una expresión alta. Sin embargo el aumento de expresión no depende sólo de la región promotora.

## Genes *Ppc*

El mismo escenario evolutivo puede ser aplicado al gen específico de la  $C_4$  PEPC. El promotor de este gen de maíz fusionado al gen reportero b-glucuronidasa GUS en plantas transgénicas de arroz ha dado lugar a

una expresión incrementada en células del mesófilo, inducible por luz (Matsuoka *et al.*, 1994).

Al menos cuatro clases de genes *Ppc* se encuentran en maíz y sorgo. La única copia del gen  $C_4$  *Ppc* muestra únicamente un alto nivel de expresión en células del mesófilo (Dong *et al.*, 1998). La comparación de secuencias reguladoras más divergentes indica que a pesar de ser muy similares, las secuencias que flanquean la zona 5' divergen en la región previa a la caja TATA. Esta observación conduce a sugerir que el gen  $C_4$  *Ppc* podría haber sido generado a partir de un ancestro gen *Ppc* después de una desigual recombinación próxima a la caja TATA con introducción de elementos reguladores necesarios para los nuevos patrones de expresión y un aumento de su actividad (Schäffner y Sheen, 1992). Posiblemente en plantas de maíz, las regiones próximas al sitio de iniciación de la transcripción de los genes son lugares con recombinaciones frecuentes de ADN y responsables de la generación de distintos patrones de expresión y de niveles diferentes entre los genes homólogos al de maíz. La comparación de las secuencias entre los genes *Ppc* ortólogos de  $C_4$  y  $C_3$  entre dicotiledóneas *F. trinervia* ( $C_4$ ) y *F. pringlei* ( $C_3$ ) ha permitido recabar información importante. Los genes *PpcA* de estas dos especies son idénticos en un 96% pero se expresan de forma diferente. Por lo que se sugiere que la mayor parte de los eventos durante la evolución de los genes  $C_4$  *PpcA* han ocurrido a nivel del promotor (Stockhaus *et al.*, 1994). Estudios de evolución y de función del promotor de *PpcA1* de *F. pringlei* ha permitido identificar el «módulo de expresión del mesófilo» (Mem1), constituyendo la secuencia tetranucleótida CACT un componente clave para la especificidad (Gowik *et al.*, 2004).

## Genes *Me*

Dos genes relacionados de NADP-*Me* han sido aislados a partir de *F. bidentis* y maíz. Sorprendentemente, ambos poseen una secuencia muy similar y un péptido de tránsito que los dirige hacia el cloroplasto, pero muestran distinto patrón de expresión. Para la descarboxilación en la especie dicotiledónea  $C_4$  amaranto, el NAD-*Me* es utilizado en la mitocondria de células de la vaina pero no el NADP-*Me*. El NAD-*Me* de amaranto comparte más similitudes con el NADP-*Me* humano que con el de maíz, de tal forma que representan un origen y proceso de evolución distinto

para los genes  $C_4$  (Berry *et al.*, 1997). Un mayor uso del nitrógeno por parte de las especies NADP-*Me* en relación a las que son NAD-*Me* es debido a un menor contenido de N en hojas, a tener proteínas solubles y a que la Rubisco tiene una actividad catalítica más rápida (Ghannoum *et al.*, 2005).

### Genes *Mdh*

Aunque dos genes NADP-*Mdh* distintos han sido encontrados, la expresión de un solo gen de *Mdh* es específica de las células del mesófilo e inducible por luz, y actúa en la fotosíntesis  $C_4$  de maíz y sorgo (Luchetta *et al.*, 1990). Sin embargo, parece que en varias especies de *Flaveria* hay un solo gen de *Mdh*, sugiriendo que un gen preexistente ha sido regulado sin duplicación durante la evolución de las plantas  $C_3$  a  $C_4$  (McGonigle y Nelson, 1995).

### Genes *Cah*

Tanto las formas citosólica como cloroplastídicas de la anhidrasa carbónica (CA) han sido caracterizadas en plantas (Burnell y Ludwig, 1997) y se sabe que la CA citosólica es específica de células del mesófilo e importante para la fotosíntesis  $C_4$ . Dos ADNc de *Cah* que codifican probablemente las proteínas necesarias para la fotosíntesis  $C_4$  han sido aislados en maíz, sorgo y *F. bidentis*, pero sólo uno de ellos aumenta su expresión de forma específica en células del mesófilo cuando las hojas son iluminadas. Todos los genes *Cah* están muy relacionados entre ellos en plantas  $C_3$  y  $C_4$ , lo que indicaría que sencillas alternaciones han sido necesarias durante la evolución para la función  $C_4$ .

### Otros genes fotosintéticos

La evolución de las plantas  $C_4$  provocaron igualmente alteraciones en la especificidad celular de los genes del ciclo de Calvin y el fotosistema II ya existentes. Al igual que ocurre en plantas  $C_3$ , la RBCS y las proteínas unidas a las clorofilas a/b (CAB) del fotosistema II están codificadas por familias multigénicas en maíz, amaranto y *Flaveria* (Berry *et al.*, 1997). Los seis genes *Cab* de maíz poseen un complejo patrón de expresión dependiente del tipo de célula y de la luz

(Sheen y Bogorad, 1986). Sin embargo, a diferencia de los genes  $C_4$  cuyo patrón de expresión es distinto de sus homólogos relacionados, todos los genes *RbcS* exhiben un patrón de expresión similar específico en las células de la vaina en plantas  $C_4$  (Ewing *et al.*, 1998).

### Expresión de genes $C_4$ en plantas transgénicas

Para identificar, caracterizar y finalmente demostrar que cualquier elemento regulador putativo asociado a los genes  $C_4$  es funcional y puede responder a un único nivel y patrón de expresión en plantas  $C_4$ , es esencial desarrollar unos métodos de transformación fiables (Chu *et al.*, 1997). A pesar de las dificultades técnicas, recientemente se han podido conseguir con éxito estudios de regulación de genes  $C_4$  en especies transgénicas de *Flaveria* y maíz.

### *Flaveria C<sub>4</sub> dicotiledónea*

Los análisis de plantas transgénicas más ampliamente desarrollados han sido llevados a cabo en la dicotiledónea  $C_4$  *F. bidentis*, basándose en un procedimiento sencillo de transformación y el uso del gen reportero b-glucuronidasa (GUS) fusionado al promotor de los genes  $C_4$ . Las plantas transgénicas fueron analizadas por técnicas histoquímicas y de separación celular. La región 5' flanqueante ó promotora (2185 bp) del gen  $C_4$  *PpcA1* de *F. trinervia* es suficiente para reproducir el patrón de expresión en su especificidad por las células del mesófilo durante el desarrollo. La región promotora (2583 bp) del gen ortólogo *PpcA1* de *F. pringlei* ( $C_3$ ) dirige la expresión del gen reportero principalmente en los tejidos vasculares de las hojas y los tallos y a bajos niveles en células del mesófilo. En primer lugar estos experimentos demuestran que los elementos reguladores cis son responsables del patrón de expresión que requiere además una cooperación sinérgica entre regiones distales (-2074 a -1501) y proximales (-570 a +1) (Westhoff *et al.*, 1997). Igualmente, la región 5' (1491 bp) del gen  $C_4$  *Pdk* dirige la especificidad de la expresión GUS hacia las células del mesófilo, esta expresión es dependiente de la luz en plantas germinadas y hojas maduras (Rosche *et al.*, 1998).

La obtención y estudio de plantas transgénicas que contienen una colección de construcciones quiméricas

creadas por las regiones 5' (hasta 2361 bp) y 3' (hasta 5900 bp) del gen  $C_4$  *Me1* de *F. bidentis* fusionado al gen GUS (Marshall *et al.*, 1997) han permitido descubrir complejos mecanismos reguladores. Aunque la región 5' determina la especificidad hacia las células de la vaina, la región 3' contiene elementos que intensifican y confieren niveles altos de expresión en hojas. Esta interacción de las secuencias 5' y 3' parece ser específica para  $C_4$  *F. bidentis* ya que la misma construcción no dirige una expresión significativa en plantas transgénicas de tabaco  $C_3$ . Por otra parte la región 3' (900 bp) del gen  $C_4$  *Me1* puede funcionar como terminador transcripcional con un promotor heterólogo en protoplastos de tabaco, ya que no incrementa la actividad del promotor. Aun queda por determinar si la región 3' afecta a la transcripción, a la estabilidad del ARNm o a la traducción. La región 5' del gen  $C_4$  *Me1* es suficiente para dirigir la expresión específica hacia las células de la vaina, mientras que la región 5' del gen  $C_3$  *Me1* dirige la expresión en todas las células. En maíz, el promotor  $C_4$  *Me1* es activo en células del mesófilo.

El promotor del gen *RbcS* de la  $C_4$  *F. trinervia* tiene un patrón de expresión específico en células de la vaina, mientras que el promotor del gen *RbcS* de la  $C_3$  *F. trinervia* muestra expresión en ambas células del mesófilo y de la vaina (T. Nelson, comunicación personal). Parece que existen elementos cis que se encuentran en la secuencia que son específicos de  $C_4$  para la expresión del gen *RbcS* de *F. trinervia* en células de la vaina. Patel y col. han mostrado que las regiones 5' y 3' no transcritas de *RbcS1* de *F. bidentis* fusionadas al gen reportero GFP (proteína fluorescente verde- 5'-UTR-gfpA-3'-UTR) son capaces de dirigir la expresión hacia las células de la vaina (Patel *et al.*, 2006). Sin embargo, el análisis de los promotores *RbcS* en células del mesófilo de maíz y de arroz y el estudio del patrón de expresión de *RbcS* en  $C_4/C_3$  híbrido *Flaveria* implica también la participación de factores de transcripción específicos de plantas  $C_4$ . De esta manera, es evidente que la regulación de la *RbcS* implica unos mecanismos complejos y distintos en las plantas  $C_4$ .

Además del estudio de la regulación de los genes, el sistema de transformación de la especie *F. bidentis*  $C_4$  ofrece una oportunidad sin precedentes para la manipulación genética de enzimas fotosintéticas clave en plantas  $C_4$  (Furbank y Taylor, 1995). Han sido generadas plantas transgénicas en antisentido de los genes  $C_4$  *Pdk* y *RbcS* que pueden reducir la enzima PPDK  $C_4$  en un 40% y la RBC en un 15% con respecto a los niveles

de los controles. Esta co-supresión implica que el gen  $C_4$  *Mdh* tenga menos del 2% de la actividad de la MDH  $C_4$  de la planta control. Bajo condiciones de iluminación saturante, los niveles de RBC tiene un efecto significativo en las tasas de fotosíntesis, sin embargo la MDH  $C_4$  tiene un impacto mínimo. Un estudio de todas estas valiosas líneas transgénicas de *Flaveria* ayudarán a un mayor conocimiento de la fotosíntesis  $C_4$ .

### Maíz $C_4$ monocotiledónea

La obtención de plantas transgénicas monocotiledóneas de maíz que contienen la región promotora (1.7 kb) del gen de maíz  $C_4$  *Ppc* es suficiente para conducir la expresión GUS de forma específica a las células del mesófilo siendo inducible por la luz al igual que le sucede al gen endógeno. Como ocurre con las dicotiledóneas  $C_4$ , la introducción de elementos reguladores de ADN para la expresión específica de genes es una etapa crucial de la evolución de los genes  $C_4$  *Ppc* de maíz. El transgen es reprimido por señales metabólicas y es completamente bloqueado cuando la biogénesis de los cloroplastos es inhibida por la luz. Los mecanismos reguladores a los que son sometidos en general los genes  $C_4$  necesitan ser integrados en la red universal de señalización que modula los genes de la fotosíntesis tanto en plantas  $C_3$  como  $C_4$  (Fankhauser y Chory, 1997; Jang y Sheen, 1998).

### Tabaco dicotiledónea $C_3$ y Arroz monocotiledónea $C_3$

Varios estudios de expresión de genes  $C_4$  en plantas transgénicas  $C_3$  dicotiledóneas de tabaco y  $C_3$  monocotiledóneas de arroz han proporcionado una información valiosa acerca de la naturaleza de la adquisición de elementos reguladores por los genes  $C_4$ . Las regiones en 5' de los genes  $C_4$  *Pdk* (-1032 a +71),  $C_4$  *Ppc* (-1212 a +78) y *RbcS* (-444 a +66) de maíz han sido introducidos en arroz transgénico (Matsuoka, 1995). Los promotores de  $C_4$  *Pdk* y  $C_4$  *Ppc* exhiben especificidad para las células del mesófilo, inducción por luz y niveles altos de actividad característica de los genes  $C_4$ . Por otra parte, se ha detectado la misma unión de los extractos nucleares de maíz y de arroz al ADN de los elementos cis en los promotores  $C_4$  *Pdk* y  $C_4$  *Ppc* (Yanagisawa,

1998). Niveles aumentados de actividad de  $C_4$  PDK y  $C_4$  PEPC han sido expresados ectópicamente en plantas transgénicas de arroz. Estos resultados abren un nuevo camino para manipular genéticamente la ruta del ciclo  $C_4$  en plantas  $C_3$ . Sin embargo, el promotor de *RbcS* de maíz  $C_4$  no mantiene el patrón de expresión específico en células de la vaina en plantas transgénicas de arroz. Esto indicaría que existen diferencias entre los factores de transcripción de maíz  $C_4$  y de arroz  $C_3$  para la regulación de los genes *RbcS*. El patrón de expresión del promotor del gen  $C_4$  *Ppc* de *F. trinervia* en plantas transgénicas de tabaco  $C_3$  apoya el concepto de que la evolución de estos genes  $C_4$  necesitan alternancia en los elementos cis reguladores. Por otra parte se ha observado que los mecanismos reguladores y de evolución de los genes  $C_4$  *Me* son únicos a las plantas  $C_4$  y no pueden ser reproducidos en plantas transgénicas de tabaco.

## Análisis de genes implicados en fotosíntesis $C_4$ por expresión transitoria

Muchos mecanismos reguladores pueden ser eficientemente investigados por ensayos de expresión transitoria utilizando sistemas celulares en los que el patrón de expresión de los genes se refleja fielmente. Actualmente, los protoplastos de mesófilo de maíz representan el sistema más sofisticado para el estudio de la expresión génica y la transducción de señales y es muy utilizado en los estudios del proceso fotosintético de plantas superiores (Chiu *et al.* 1996). También se han empleado protoplastos de arroz, tabaco y *Arabidopsis*. Sin embargo, el sistema de protoplastos tiene una limitación ya que las células de la vaina con una intensa actividad de expresión son difíciles de aislar. Un ensayo alternativo de expresión transitoria consiste en transformar el tejido completo de maíz ó *Flaveria* con micro proyectiles envueltos de ADN (Bansal Y Bogorad, 1993; T. Nelson, comunicación personal). Por otra parte, el análisis histoquímico de los tejidos intactos o el ensayo fluorimétrico de extractos de tejidos basados en la actividad GUS también son utilizados para los ensayos de expresión transitoria.

*Pdk*, *Ppc*, *RbcS* y *Cab* han sido algunos de los genes analizados por expresión transitoria. El estudio de sus promotores completos y delecionados han permitido identificar los elementos cis-reguladores necesarios para sus expresiones específicas en los distintos tejidos, determinar la intensidad de su expresión así como

detectar la inducción y dependencia de la luz. A partir de estos análisis, se ha podido comprobar que los promotores de los genes  $C_4$  *Ppc* y  $C_4$  *Pdk* de maíz no comparten elementos reguladores comunes, indicando una evolución independiente.

Sin embargo, a pesar de la identificación de numerosos elementos de secuencia cis reguladores importantes para la expresión de genes  $C_4$  en maíz, poco se sabe acerca de las propiedades de los correspondientes factores de transcripción (factores trans). Estudios recientes han sido dirigidos hacia el estudio de la regulación del promotor del gen  $C_4$  *Ppc* de maíz por la proteína zinc-finger Dof1 que está altamente conservada entre los factores de transcripción y relacionada con el metabolismo carbonado (Yanagisawa y Sheen, 1998). Se ha observado que los promotores de los genes *RbcS* de maíz son muy activos e inducibles por la luz en protoplastos de mesófilo transfectados. Investigaciones recientes muestran que los promotores de *RbcS* monocotiledóneas (maíz, trigo, arroz) son activos en protoplastos de maíz y trigo independientemente de su origen  $C_4$  o  $C_3$ , mientras que los promotores de dicotiledóneas (guisante, tabaco y *Arabidopsis*) solo son activos en protoplastos de tabaco (Matsuoka, 1995; Schäffner y Sheen, 1991; Terzaghi y Cashmore, 1995). Esto, no ocurre en el caso de los genes *Cab*, que se pueden expresar indistintamente en protoplastos de dicot o monocotiledóneas, aunque con diferencias en los niveles de expresión (Chiu *et al.*, 1996).

Al menos seis miembros de la familia de los genes *Cab* se expresan de forma diferencial en células del mesófilo y de la vaina de hojas de maíz (Bansal y Bogorad, 1993). Ensayos de expresión transitoria *in situ* basados en micro proyectiles han permitido identificar elementos cis reguladores específicos de células del mesófilo para *Cab-m1*, gracias a la técnica de actividad del gen reportero GUS. Mientras algunos elementos sobreexpresan la actividad en células del mesófilo otros la inhiben en células de la vaina (Bansal y Bogorad, 1993).

## Regulación de los genes cloroplastídicos en plantas $C_4$

La coordinación funcional entre el núcleo y el cloroplasto es evidente en plantas  $C_4$  como se puede constatar en la expresión diferencial de RBCS, codificado por el núcleo, en células de la vaina que está

acompañado por una coordinación específica de RBCL codificado por el cloroplasto. Se sabe que en cloroplastos sin grana de las células de la vaina de maíz abundan los cloroplastos dimórficos. En estas células la actividad del fotosistema II es muy reducida, las proteínas que constituyen este fotosistema están codificadas tanto por genes nucleares como cloroplásticos. Estudios de ARN y proteínas indican que los transcritos y las proteínas codificados por los genes *psbA*, B, C, D y E/F (que codifican proteínas del fotosistema II) predominan en las células del mesófilo mientras que aquellos que están codificados por *RbcL* son específicos de las células de la vaina. Sin embargo en estudios realizados en células del mesófilo y células de la vaina de hojas verdes de maíz se observan mínimas diferencias en la actividad transcripcional de *RbcL* y *Psb*. Es probable entonces que la regulación postranscripcional también sea importante. Así, en células del mesófilo y de la vaina de plantas etioladas de maíz se pueden detectar los transcritos de *RbcL* pero no su proteína. La iluminación incrementa su expresión en células de la vaina y la reprime en células del mesófilo. Las señales y mecanismos moleculares para la regulación de los ARNm en el núcleo y el cloroplasto en célula de la vaina y del mesófilo siguen siendo desconocidos (Taylor, 1989).

### Regulación de la expresión de genes $C_4$ por diversas señales

En general el nitrógeno es un factor limitante en la capacidad fotosintética. Las plantas  $C_4$  no solo tienen mayor eficiencia que las  $C_3$  en el uso de la luz y del agua, sino además usan el nitrógeno de forma más eficiente, probablemente debido a la baja fotorespiración que afecta al metabolismo del carbono y del nitrógeno (Oaks, 1994; Sugimaya, 1998). En plántulas de maíz, la falta de nitrógeno, nitrato, amonio ó glutamina puede inducir la acumulación de transcritos codificados por los  $C_4$  *Ppc* y *Cab* en hojas (Sugimaya, 1998). En esta regulación están implicados tanto mecanismos transcripcionales como postranscripcionales.

Estudios recientes han demostrado que la señal de nitrógeno es detectada por las raíces y estimula la acumulación de citokininas, que activan la expresión de los genes  $C_4$  en hojas (Sakakibara, 1998).

La represión por metabolitos de la transcripción de los genes  $C_4$  ha sido extensamente demostrada utilizando promotores de genes  $C_4$  en protoplastos de mesófilo

de maíz (Jang y Sheen, 1994). Los estudios muestran que el promotor de  $C_4$  *Pdk* es reprimido específicamente por sacarosa, glucosa, fructosa, acetato y glicerol. Al menos siete promotores de maíz son controlados por distintos elementos de secuencia cis, dependientes de azúcares y glicerol, sin embargo ninguna secuencia consenso ha podido ser identificada como responsable de la represión por azúcares.

El ácido abscísico (ABA) y las señales de estreses ambientales reprimen la expresión de genes fotosintéticos  $C_4$ . Sin embargo, en plantas de arroz estresadas, las actividades PPDK, PEPC y MDH son inducidas (Monsi *et al.*, 1998). Debido a que las plantas se adaptan a los cambios ambientales, su habilidad para alterar el metabolismo del carbono a través de la expresión génica ofrece mucha flexibilidad y adaptabilidad para la supervivencia.

La regulación por la luz de la fotosíntesis  $C_4$  es la que conlleva el mayor número de mecanismos postranscripcionales distintos para el control de las actividades enzimáticas. Muchos de ellos lo hacen a través de procesos intermediarios que incluyen fosforilación, proteínas reguladoras (PR), liberación de calcio o mecanismos redox. Los fotorreceptores de luz roja, azul y ultravioleta son los que perciben la luz controlando la expresión de muchos de los genes de la fotosíntesis  $C_4$  (Casati *et al.*, 1998). Mediante ensayos de expresión transitoria *in situ*, se ha podido mostrar que el gen *RbcS-m3* es estimulado en células de la vaina a través de la ruta de señalización del fitocromo rojo/rojo lejano. Sin embargo, la luz azul es necesaria para su supresión en células del mesófilo de hojas de maíz iluminadas (Purcell *et al.*, 1995). En relación con la luz UV y sus distintos efectos de inducción o represión de los genes, se propone que la inducción de las enzimas  $C_4$  puede contribuir a reparar los daños causados por la luz UV mediante el aporte de poder reductor, incrementando el piruvato para la respiración, y proporcionando sustratos para la síntesis de lípidos y la reparación de las membranas (Casati *et al.*, 1998).

### Análisis genético de la regulación de los genes $C_4$

#### Mutantes de maíz

Para disecar la ruta de la diferenciación celular que lleva a la fotosíntesis dimórfica, se ha utilizado un

poderoso método genético para aislar mutantes de maíz que exhiben desarrollo foliar anómalo (Dengler y Nelson, 1998). Se han caracterizado mutantes defectivos en las células de la vaina (*bundle sheath defective*, *bsd*), mostrando una deformación específica en este tipo de células (Roth *et al.*, 1996). Algunos de los mutantes como *bsd1* afectan a la biogénesis del cloroplasto y a la expresión génica de *RbcS*, *RbcL* y *Me C<sub>4</sub>* específicamente en células de la vaina. Por otra parte el mutante *bsd2* perturba la traducción de la proteína RBC (Rubisco), su acumulación y ensamblaje. El análisis de otros mutantes permitirá entender ampliamente los mecanismos de desarrollo de las plantas de maíz *C<sub>4</sub>*.

### Mutantes de amaranto y *Flaveria C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>* híbridos

La búsqueda de plantas capaces de crecer a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> pero que muestran síntomas de estrés ó clorosis tras la exposición a aire normal, ha permitido aislar algunos mutantes de *Amaranthus edulis*. Estos mutantes muestran niveles bajos de PEPC o falta de NAD-ME, esenciales para la fotosíntesis *C<sub>4</sub>* y permiten estudiar la regulación de estas enzimas y la fotorespiración durante la fotosíntesis *C<sub>4</sub>* (Lacuesta *et al.*, 1997). Los estudios de los híbridos F1 obtenidos a partir del cruce de la *C<sub>4</sub>* *F. palmeri* y la *C<sub>3</sub>* *F. ramossissima* sugieren que la especificidad por las células de la vaina de la expresión *RbcS* en la variedad *C<sub>4</sub>* es recesiva y puede ser controlada por uno o varios factores trans. La regulación de *RbcS* parece bastante más complejo según los primeros datos obtenidos del análisis de estos mutantes. Por otra parte, la expresión del gen *C<sub>4</sub>* *Pdk* es dominante y mediada por elementos cis de la secuencia del promotor (Shu *et al.*, 1998).

### Mutantes de arroz

Dos nuevos super-híbridos de arroz (*Oryza sativa* L.), liangyoupeijiu y Hua-an 3, mostraron mayor fotosíntesis neta que el híbrido tradicional, Shanyou 63. También mostraron mayor eficiencia de carboxilación y capacidad de fijación del CO<sub>2</sub>. La actividad de las enzimas *C<sub>4</sub>* del primer super híbrido es superior al híbrido tradicional. Todo ello repercute en una mayor eficiencia fotosintética siendo este el primer factor que

contribuye en una mayor producción de grano (Wang *et al.*, 2006).

### Cómo sobreproducir enzimas *C<sub>4</sub>* en células del mesófilo de plantas *C<sub>3</sub>*

Inicialmente la obtención de híbridos entre *C<sub>3</sub>* y *C<sub>4</sub>* dio como resultado varios híbridos *C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>* infértiles (Brown y Bouton, 1993). A lo largo de los últimos 10 años la aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha permitido un progreso importante de la ingeniería molecular de los genes fotosintéticos y se ha intensificado el estudio para entender el escenario evolutivo de los genes fotosintéticos *C<sub>4</sub>*. Actualmente se están obteniendo plantas *C<sub>3</sub>* transgénicas que sobreexpresan múltiples enzimas *C<sub>4</sub>* para mejorar el proceso fotosintético en plantas *C<sub>3</sub>*.

Para alterar el metabolismo del carbono en hojas de plantas *C<sub>3</sub>* es necesario sobreproducir enzimas *C<sub>4</sub>* en las células de plantas *C<sub>3</sub>*, mediante la introducción de genes *C<sub>4</sub>*. Por el contrario para producir estas enzimas en células de la vaina se pueden utilizar técnicas convencionales de construcción de genes fusionados a promotores fuertes. Además de introducir el gen apropiado para la sobreproducción de enzimas *C<sub>4</sub>* en plantas *C<sub>3</sub>*, es necesario rastrear un gran numero de transformantes hasta conseguir el nivel de expresión deseado y confirmar la localización de la enzima *C<sub>4</sub>* en las hojas de plantas *C<sub>3</sub>*.

La actividad transcripcional de promotores específicos *C<sub>4</sub>* no es suficiente para obtener niveles de expresión altos. Las regiones 5' y 3' no codificantes tampoco pueden inducir por sí mismas niveles de expresión intensos. Es muy probable que además de la región promotora sea necesaria la presencia de intrones o de la secuencia de terminación o la combinación de ambos para conseguir un incremento del nivel de expresión.

En plantas transgénicas de arroz que contienen los genes *C<sub>4</sub>* *Ppc* o *Pdk*, los niveles de transcritos y de proteínas así como la actividad de las enzimas *C<sub>4</sub>* en las hojas se correlacionaban bien con el número de copias del gen introducido (Ku *et al.*, 1999; Fukayama *et al.*, 2001). Sin embargo, la sobreproducción mediante la introducción de genes *C<sub>4</sub>* específicos intactos, parecen tener algunas limitaciones en el uso de plantas filogenéticamente próximas para alcanzar niveles de expresión aumentados de enzimas *C<sub>4</sub>* en plantas *C<sub>3</sub>*. En general, la expresión de transgenes puede ser impedida por varios

mecanismos tales como efectos de posición (Gelvin, 1998), silenciamiento (Gallie, 1998; Chandler and Vaucheret, 2001) y reordenamientos de los transgenes (Hiei *et al.*, 1994).

## Aplicaciones futuras de la sobreexpresión de enzimas $C_4$

El principal objetivo de la sobreproducción de enzimas  $C_4$  en plantas  $C_3$  es el de mejorar la actividad fotosintética y por lo tanto la producción de ciertas plantas de interés agrícola. Sin embargo, aún no se han podido observar totalmente los efectos positivos de la fotosíntesis en plantas transgénicas  $C_3$  que sobreproducen enzimas  $C_4$  (Häusler *et al.*, 2002). No obstante lo que sí se ha podido observar es que, además de mejorar la fotosíntesis, la sobreproducción de una única enzima  $C_4$  parece tener algunos efectos positivos en la fisiología de las plantas  $C_3$ . La producción de fotosíntesis  $C_4$  en una célula  $C_3$  es teóricamente poco eficiente pero puede mejorar la difusión del  $CO_2$ , una de las limitaciones de las hojas  $C_3$ . También se ha visto que la expresión de la PPDK cloroplastídica incrementa el número de semillas en la vaina así como el peso de las mismas en plantas transgénicas de tabaco (Sheriff *et al.*, 1998), mientras que la sobreproducción de PEPC específico de maíz  $C_4$  mejoró la resistencia al aluminio durante la elongación de la raíz de arroz transgénico (Miyao *et al.*, 2001). Considerando la variedad de funciones específicas de las enzimas  $C_3$ , no es improbable que la sobreproducción de enzimas  $C_4$  pueda mejorar algunas de las características de las plantas  $C_3$ .

## Referencias bibliográficas

- AGARIE, S.; KAI, M.; TAKATSUJI, H. y UENO, O., 1997. «Expresión de  $C_3$  and  $C_4$  photosynthetic characteristics in the amphibious plant *Eleocharis vivipara*: structure and analysis of the expression of isogenes for pyruvate, orthophosphate dikinase». *Plant Mol.Biol.* 34, 363-69.
- BANSAL, K.C. y BOGORAD, L., 1993. «Cell type-preferred expression of maize cab-m1: repression in bundle sheath cells and enhancement in mesophyll cells». *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90, 4057-61.
- BERRY, J.O.; McCORMAC, D.J.; LONG, J.J.; BOINSKI, J. y COREY, A.C., 1997. «Photosynthetic gene expression in amaranth, and NAD-ME type  $C_4$  dicot». *Aust. J. Plant Physiol.* 24, 423-28.
- BLACK JR., C.C., 1973. «Photosynthetic carbon fixation in relation to net  $CO_2$  uptake». *Annual Review of Plant Physiology* 24, 253-286.
- BROGLIE, R.; CORUZZI, G.; KEITH, B. y CHUA, N.-H., 1984. «Molecular biology of  $C_4$  photosynthesis in Zea mays: differential localization of proteins and mRNAs in the two cell types». *Plant Mol.Biol.* 3, 431-44.
- BROWN y BOUTON, J.H., 1993. «Physiology and genetics of interspecific hybrids between photosynthetic types». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 435-456.
- BURGENER, M.; SUTER, M.; JONES, S. y BRUNOLD, C., 1998. «Cyst(e)ine is the transport metabolite of assimilated sulfur from bundle sheath to mesophyll cells in maize leaves». *Plant Physiol.* 10, 369-73.
- BURNELL, J.N. y LUDWIG, M., 1997. «Characterization of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in maize leaves». *Aust. J. Plant Physiol.* 24, 451-58.
- CASATI, P.; DRINCOVICH, M.F.; ANDREO, C.S.; DONAHUE, R. y EDWARDS, G.E., 1998. «UV-B, red and far red light regulate induction of the  $C_4$  isoform of NADP-malic enzyme in etiolated maize seedlings». *Aust. J. plant Physiol.* 25, 701-8.
- CHANDLER, V.L. y VAUCHERET, H., 2001. «Gene activation and gene silencing». *Plant Physiology* 125, 145-148.
- CHENG, W.-H.; IM, K.H. y CHOUREY, P.S., 1996. «Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transitions in maize leaf». *Plant Physiol.* 111, 1021-29.
- CHIU, W.-L.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H. y SHEEN, J., 1996. «Engineered GFP as a vital reporter in plants». *Curr. Biol.* 6, 325-30.
- CHU, C.-C.; QU, N.; BASSUNER, B. y BAUWE, H., 1997. «Genetic transformation of the  $C_3$ - $C_4$  intermediate species, *Flaveria pubescens* (Asteraceae)». *Plant Cell Rep.* 16, 715-18.
- DENGLER, N.G.; DENGLER, R.E. y HATTERKLEY, P.W., 1985. «Differing ontogenic origins of PCR («Kranz») sheaths in leaf blades of  $C_4$  grasses (Poaceae)». *Am. J. Bot.* 72: 284-302.
- DENGLER, N.G. y NELSON, T., 1998. «Leaf structure and development in  $C_4$  plants». In *The Biology of  $C_4$  Photosynthesis*, ed. R.Sage, R Monson.
- DENGLER, N.G. y TAYLOR, W.C., 1998. «Developmental aspects of  $C_4$  photosynthesis». In *advances in Photosynthesis*, ed. R. Leegood.
- DONG, L.-Y.; MASUDA, T.; KAWAMURA, T.; HATA, S. y IZUI, K., 1998. «Cloning expression and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from Zea mays: comparison with the  $C_4$ -form enzyme». *Plant Cell Physiol.* 39, 865-73.
- EDWARDS, G.E.; KU, M.S.B. y MONSON, R.K., 1985. « $C_4$  photosynthesis and its regulation». In *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*, ed. J. Barber, NR Baker, pp. 289-327. New York: Elsevier.
- EDWARDS, G.E. y WALKER, D.A., 1983.  $C_3$ ,  $C_4$ : *Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Sci.
- EHLERINGER, J.R. y MONSON, R.K., 1993. «Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation». *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 411-39.
- EWING, R.; JENKINS, G. y LANGDALE, J., 1998. «Transcripts of maize RbcS genes accumulate differentially in  $C_3$ - and  $C_4$ -tissues». *Plant Mol. Biol.* 36, 593-99.
- FANKHAUSER, C. y CHORY, J. 1997. «Light control of plant development». *Annu.rev.Cell.Dev.biol.* 13, 203-29.
- FUKAYAMA, H.; TSUCHIDA, H.; AGARIE, S. *et al.*, 2001. «Significant accumulation of  $C_4$ -specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a  $C_3$  plant rice». *Plant Physiology* 127, 1136-1146.

- FURBANK, R.T. y TAYLOR, W., 1995. «Regulation of photosynthesis in  $C_3$  and  $C_4$  plants: a molecular approach». *Plant Cell* 7, 797-807.
- GALLIE, D.R., 1998. Controlling gene expression in transgenics. Current opinion in *Plant Biology* 1, 166-172.
- GELVIN, S.B., 1998. «The introduction and expression of transgenes in plants». Current Opinion in *Biotechnology* 9, 227-232.
- GHANNOUM, O.; EVANS, J.R.; CHOW, W.S.; ANDREWS, T.J.; CONROY, J.P.; VON CAEMMERER, S., 2005. «Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme  $C_4$  grasses». *Plant Physiol.* 137, 638-50.
- GLACKIN, C. y GRULA, J., 1990. «Organ-specific transcripts of different size and abundance derive from the same pyruvate, orthophosphate dikinase gene in maize». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3004-8.
- GOWIK, U.; BURSCHEIDT, J.; AKYILDIZ, M.; SCHLUE, U.; KOZOR, M.; STREUBEL, M. y WESTHOFF, P., 2004. «Cis-regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the  $C_4$  plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase gene». *Plant Cell* 16, 1077-1090.
- HATCH, M.D., 1987. « $C_4$  photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure». *Biochim. Biophys. Acta* 895, 81-106.
- HATCH, M.D., y BURNELL, J., 1990. «Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step in  $C_4$  photosynthesis». *Plant Physiol.* 93, 380-83.
- HATCH, M.D., 1997. «Resolving  $C_4$  photosynthesis: trials, tribulations and other unpublished stories». *Aust. J. plant Physiol.* 24, 413-422.
- HAUSLER, R.E.; HIRSCH, H.J.; KREUZALER, F. y PETERHÄNSEL, C., 2002. «Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the  $CO_2$  compensation point ( $\Gamma^*$ ) and enhances dark and light respiration in transgenic potato». *Journal of Experimental Botany* 50, 1231-1242.
- HERMANS, J. y WESTHOFF, P., 1990. «Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* ( $C_4$ ) and *Euphorbia* ( $C_3$ )». *Mol.Gen.Genet.* 224, 459-68.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T. y KUMASHIRO, T., 1994. «Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA». *The Plant Journal* 6, 271-282.
- KU, M.S.B.; KANO-MURAKAMI, Y. y MATSUOKA, M., 1996. «Evolution and expresión of  $C_4$  photosynthesis genes». *Plant Physiol.* 111, 949-957.
- KU, M.S.B.; AGARIE, S.; NOMURA, M.; FUKAYAMA, H.; TSUCHIDA, H.; ONO, K.; HIROSE, S.; TOKI, S.; MIYAO, M. y MATSUOKA, M., 1999. «High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants». *Nature Biotechnology* 17, 76-80.
- JANG, J.-C. y SHEEN, J., 1994. «Sugar sensing in higher plants». *Plant Cell* 6, 1665-79.
- 1998. «Sugar sensing and signalling in higher plants». *Trends Plant Sci.* 2, 208-14.
- LACUESTA, M.; DEVER, L.V.; MUÑOZ-RUEDA, A. y LEA, P.J., 1997. «A study of photorespiratory ammonia production in the  $C_4$  plant *Amaranthus edulis*, using mutants with altered photosynthetic capacities». *Physiol. Plant.* 99, 447-55.
- LANGDALE, J.A.; ZELITCH, I.; MILLER, E. y NELSON, T., 1988. «Cell position and light influence  $C_4$  versus  $C_3$  patterns of photosynthetic gene expression in maize». *EMBO J.* 7, 3643-51.
- LANDALEJA, J.A. y NELSON, T., 1991. «Spatial regulation of photosynthetic development in  $C_4$  plants». *Trends Genet.* 7, 191-96.
- LEPINIEC, L.; KERYER, E.; PHILIPPE, H.; GADAL, P. y CRETIN, C., 1993. «Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution». *Plant Mol. Biol.* 21, 487-502.
- LINK, G.; COEN, D.M. y BOGORAD, L., 1978. «Differential expresión of the gene for the large subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase in maize leaf cell type». *Cell* 15, 725-31.
- LONG, J. y BERRY, J., 1996. «Tissue-specific and light-mediated expression of the  $C_4$  photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria». *Plant Physiol.* 112, 473-82.
- LUCHETTA, P.; CRETIN, C. y GADAL, P., 1990. «Structure and characterization of the Sorghum vulgare gene encoding NADP-malate dehydrogenase». *Gene* 8, 171-17.
- MARSHALL, J.; STUBBS, J.; CHITTY, J.; SURIN, B. y TAYLOR, W., 1997. «Expression of the  $C_4$  Me1 gene from *Flaveria bidentis* requires an interaction between 5' and 3' sequences». *Plant Cell* 9, 1515-25.
- MATSUOKA, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. y KANO-MURAKAMI, Y., 1994. «The promoters of two carboxylases in a  $C_4$  plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a  $C_3$  plant (rice)». *Plant J.* 6, 311-19.
- MATSUOKA, M., 1995. «The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in  $C_4$  plants: structure, regulation and evolution». *Plant Cell Physiol.* 36, 937-43.
- MCCORMAC, D.; BOINSKI, J.J.; RAMSPERGER, V.C. y BERRY, J.O., 1997. « $C_4$  gene expression in photosynthetic and non-photosynthetic leaf regions of *Amaranthus tricolor*». *Plant Physiol.* 114, 801-15.
- MCGONIGLE, B. y NELSON, T., 1995. « $C_4$  isoform of NADP-malate dehydrogenase, cDNA cloning and expression in leaves of  $C_4$ ,  $C_3$ , and  $C_3$ - $C_4$  intermediate species of *Flaveria*». *Plant Physiol.* 108, 1119-26.
- MIYAO, M.; FUKUYAMA, H.; TAMAI, T. y MATSUOKA, M., 2001. «High level expresión of  $C_4$  photosynthesis enzymes in transgenic rice». In: *Proceedings of 12<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Canberra, Australia*: CSIRO Publishing, S39-001.
- MOONS, A.; VALCKE, R. y MONTAGU, M.V., 1998. «Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a  $C_3$  plant». *Plant J.* 15, 89-98.
- NELSON, T. y LANGDALE, J.A., 1992. «Developmental genetics of  $C_4$  photosynthesis». *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 25-47.
- OAKS, A., 1994. «Efficiency of nitrogen utilization in  $C_3$  and  $C_4$  cereals». *Plant Physiol.* 106, 407-14.
- PATEL, M.; SIEGEL, A.J. y BERRY, J.O., 2006. «Untranslated regions of FbRbcS1 mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a  $C_4$  plant». *J. Biol. Chem.* 281(35), 25485-91.
- PURCELL, M.; MABROUK, Y.M. y BOGORAD, L., 1995. «Red/far red and blue light responsive regions of maize rbcS-m3 are active in bundle sheath and mesophyll cells, respectively». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11504-8.
- RAMSPERGER, V.C.; SUMMERS, R.G. y BERRY, J.O., 1996. «Photosynthetic gene expression in meristems and during initial

- leaf development in a C<sub>4</sub> dicotyledonous plant». *Plant Physiol.* 111, 999-1010.
- ROSCHÉ, E.; CHITTY, J.; WESTHOFF, P. y TAYLOR, W.C., 1998. «Analysis of promoter activity for the gene encoding pyruvate orthophosphate dikinase in stably transformed C<sub>4</sub> *Flaveria* species». *Plant Physiol.* 117, 821-29.
- ROTH, R.; HALL, L.N.; BRUTHELL, T.P. y LANGDALE, J.A., 1996. «Bundle sheath defective2, a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cells in the maize leaf». *Plant Cell* 8, 915-27.
- SAKAKIBARA, H.; SUZUKI, M.; TAKEI, K.; DEJI, A.; TANIGUCHI, M. y SUGIYAMA, T., 1998. «A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize». *Plant J.* 14, 337-44.
- SCHÄFFNER, A.R. y SHEEN, J., 1991. «Maize *rbcS* promoter activity depends on sequence elements not found in dicot *rbcS* promoters». *Plant Cell* 3, 2582-86.
- 1992. «Maize C<sub>4</sub> photosynthesis involves differential regulation of maize PEPC genes». *Plant J.* 2, 221-32.
- SHEEN, J., 1991. «Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes». *Plant Cell* 3, 225-45.
- SHEEN, J.-Y. y BOGORAD, L., 1986. «Differential expression of six light-harvesting chlorophyll a/b binding protein genes in maize leaf cell types». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7811-15.
- SHEEN, J.-Y. y BOGORAD, L., 1987. «Differential expression of C<sub>4</sub> pathway genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves». *J. Biol. Chem.* 262, 11726-30.
- SHENTON, M.A.; FONTAINE, V.; HARTWELL, J.; MARSH, J.T.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 2006. «Distinct patterns of control and expression amongst members of the PEP carboxylase kinase gene family in C<sub>4</sub> plants». *The Plant Journal* 48 (1), 45–53.
- SHERIFF, A.; MEYER, H.; RIEDEL, E.; SCHMITT, J.M. y LAPKE, C., 1998. «The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C<sub>3</sub> plant with respect to the intracellular location of the enzyme». *Plant Science* 136, 43-57.
- SHU, G.; REICHARDT, M. y METS, L., 1998. «Genetic control of cell type-specific expression of *rbcS* genes in C<sub>4</sub> plants: evidence from the F1 hybrids and backcross segregates of *Flaveria palmeria* (C<sub>4</sub>) and *Flaveria ramosissima* (non-C<sub>4</sub>)». *Plant Physiol.* 117, 1011-19.
- SINHA, N. y KELLOGG, E., 1996. «Parallelism and diversity in multiple origins of C<sub>4</sub> photosynthesis in the grass family». *Am. J. Bot.* 83, 1458-70.
- STOCKHAUS, J.; POETSCH, W.; STEINMÜLLER, K. y WESTHOFF, P., 1994. «Evolution of the C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase promoter in the C<sub>4</sub> dicot *Flaveria trinervia*: an expression analysis in the C<sub>3</sub> plant tobacco». *Mol. Gen. Genet.* 245, 286-93.
- SUGIYAMA, T., 1998. «Nitrogen-responsive expression of C<sub>4</sub> photosynthesis genes in maize». In *Stress Responses of Photosynthetic organisms*, ed. K Satoh, N Murata, pp. 167-80. Tokyo: Elsevier.
- TAYLOR, W.C., 1989. «Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes». *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 211-33.
- TERZAGHI, W.B. y CASHMORE, A.R., 1995. «Light-regulated transcription». *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 445-74.
- UENO, O., 1998. «Induction of Kranz anatomy and C<sub>4</sub>-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid». *Plant Cell* 10, 517-83.
- WALBOT, V., 1977. «The dimorphic chloroplasts of the C<sub>4</sub> plant *panicum maximum* contain identical genomes». *Cell* 11, 729-37.
- WANG, J.-L.; LONG, J.; HOTCHKISS, T. y BERRY, J., 1993. «Regulation of C<sub>4</sub> gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons». *Plant Physiol.* 102, 1085-93.
- WANG, Q.; ZHANG, Q.; FAN, D. y LU, C., 2006. «Photosynthetic light and CO<sub>2</sub> utilization and C<sub>4</sub> traits of two novel super-rice hybrids». *J. of Plant Physiology* 163: 529-537.
- WESTHOFF, P.; SVENSSON, P.; ERNST, K.; BLÄSING, O.; BURSCHEIDT, J. y STOCKHAUS, J., 1997. «Molecular evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in the genus *Flaveria*». *Aust. J. Plant Physiol.* 24:429-36.
- WYRICH, R.; DRESSEN, U.; BROCKMANN, S.; STREUBEL, M. y CHANG, C. *et al.*, 1998. «The molecular basis of C<sub>4</sub> photosynthesis in sorghum: isolation, characterization and RFLP mapping of mesophyll- and bundle-sheath specific cDNAs obtained by differential screening». *Plant Mol. Biol.* 37, 319-35.
- YANAGISAWA, S. y SHEEN, J., 1998. «Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression». *Plant Cell* 10, 75-89.



# Plantas autóctonas C<sub>4</sub> y CAM del Mediterráneo español: identificación y análisis

MANUEL SANTANA\*, ANTONIO J. SERRATO RECIO\*,  
A. JUAN SÁNCHEZ-RAYA\*\*, JOSÉ ÁNGEL TRAVERSO\*,  
EDUARDO PAGANO\*\*\* y ANA CHUECA

## Resumen

Se pretende evaluar las posibilidades de plantas C<sub>4</sub> y plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) de nuestros territorios mediterráneos en el sur de la Península Ibérica, como auxiliares técnicos en acciones de revalorización agroambiental, allí donde no es posible una respuesta convencional. Estas plantas, adaptadas a ambientes de fuerte estrés hídrico, permiten objetivos integrales de protección del suelo, lucha contra la desertificación, mejora de tierras agrarias y usos pastorales. Hasta ahora la mayoría de los estudios realizados con las plantas C<sub>4</sub> y CAM o se han limitado a objetivos estrictamente científicos o se han basado en resultados agrícolas económicamente relevantes. Esto ha infravalorado el interés de poner a punto métodos rápidos y eficientes para su diagnóstico. Este trabajo intenta consolidar la capacidad de entender y de utilizar plantas pertenecientes a la flora autóctona que es la mejor adaptada a su ambiente y a la larga historia del paisaje. Una de nuestras innovaciones será el desarrollo de métodos rápidos y operativos, lo que permitirá una incorporación sencilla en un paquete tecnológico. Para ello, mediante una activa campaña prospectiva, se identifican y analizan plantas autóctonas, mediante técnicas ya descritas y otras basadas en los recientes avances de la inmunología y biología molecular, con el uso de sondas moleculares específicas de proteínas de las C<sub>4</sub> y CAM.

## Summary

This work intends to assess the potential technological uses of C<sub>4</sub> and CAM plant species in the mediterranean region. Auxiliary instruments for the revaluation of arid agrosystems are needed in those plants in which conventional strategies are not viable. These plants are adapted to high water stress environments and thus enable the achievement of more holistic goals (e.g., soil protection, the struggle against desertification, improvements of agricultural and grazing lands). The relevance of this type of studies has been demonstrated in investigation done by researchers involved

in this proposal. It is also our intention to extend these experiments to other areas of interest. The development of this study will lead us to develop new elements of diagnostic methodology, as it is the case of all applied research studies, this one will require specific support studies in order to clarify certain critical questions (for example, many C<sub>4</sub> and CAM taxa have not yet been identified or described). Almost all of the research done to date on these plants has either been strictly scientific or has dealt with agricultural issues of economic relevance. This has led to an underestimation of the practical importance of faster and more efficient identification methodologies. One of our innovative contributions would be the development of fast transportable methods for physiological, biochemical, immunological and molecular biology determinations, which could be easily incorporated into technological packages.

## Antecedentes y estado actual del conocimiento

El estado del conocimiento que tenemos sobre los recursos botánicos del planeta nos proporciona una información equívoca tanto en lo que se refiere a nuestros aparentemente extensos y bien documentados herbarios y catálogos florísticos, como en nuestros bien editados documentos sobre vegetación, crecientemente apoyados en técnicas informáticas modernas y en sensores remotos pero, paradójicamente, cada vez menos supervisados en campo. Tampoco en los aspectos celulares, fisiológicos, bioquímicos, o genéticos, se va mucho más allá de un escaso grupo de plantas de común referencia en todas las citas bibliográficas del mundo. Ni en las vertientes más utilitaristas de este conocimiento (usos técnicos, industriales, etc.) hallaremos una base mayor. En definitiva, apenas estamos empezando a conocer la flora de la Tierra, el significado ecológico de muchas de sus especies más notables, o de sus posibilidades de uso.

En determinadas zonas geográficas caracterizadas por una fuerte irradiación solar, temperaturas elevadas,

\* Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.

\*\* Departamento de Microbiología. Metabolismo del Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1. 18008 Granada, España.

\*\*\* Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, 1417-Buenos Aires, Argentina.

déficit hídrico u otras condiciones estresantes, encuentran circunstancias adecuadas de desarrollo un tipo de especies vegetales denominadas plantas  $C_4$  y CAM (Ehleringer, 1989; Ehleringer *et al.*, 1997). Este nombre deriva de un proceso fotosintético particular, en el que los primeros productos de la asimilación del  $CO_2$  son compuestos carbonados de 4 átomos de carbono (malato y oxalacetato, fundamentalmente), frente a los de 3 átomos de carbono de las especies  $C_3$ . Todo ello resulta consecuencia de una forma particular en la captación primaria del  $CO_2$  atmosférico, que tiene lugar en las plantas  $C_4$  por una enzima (fosfoenol-piruvato carboxilasa) distinta de la utilizada por las especies  $C_3$  (Rubisco), así como de una anatomía singular de la hoja (anatomía Kranz) derivada de la coexistencia en las especies  $C_4$  de dos tipos distintos de cloroplastos (mesofílicos y del parénquima vascular), frente a un único tipo en las plantas  $C_3$  (del tejido mesofílico en empalizada), lo que implica, entre otros aspectos, la pérdida de la asimetría dorsiventral del tejido foliar de éstas (Hatch, 1992).

Este metabolismo y estructura particulares representan adaptaciones dirigidas a establecer mecanismos locales de concentración del  $CO_2$  atmosférico (0,034 % como media actual, aunque en alza como consecuencia de la quema incontrolada de combustibles fósiles), a evitar el efecto negativo de la alta concentración (16%) ambiental de  $O_2$  (aumento de fotorespiración, un proceso probablemente reléctico, que implica una disminución del rendimiento fotosintético), y a minimizar las pérdidas de agua por transpiración. Como consecuencia de todo ello estas especies pueden superar las condiciones adversas ya indicadas, colonizando hábitats en que las especies mas convencionales  $C_3$  tendrían precarias posibilidades de viabilidad, no compitiendo por tanto con éstas (Voznesenskaya, 1999). Una particularidad de las plantas  $C_4$  es su elevada tasa de fotosíntesis neta, lo que se traduce en una mayor capacidad asimilatoria por unidad de superficie foliar y, en última instancia, de materia orgánica acumulada por unidad superficial de terreno. También exhiben las plantas  $C_4$  un menor consumo y mejor aprovechamiento del nitrógeno, derivado fundamentalmente de sus inferiores necesidades en Rubisco, la enzima cloroplastídica, responsable de la captación primaria del carbono en las especies  $C_3$ , y que constituye el 50% del contenido proteico de la organela, como forma de compensar su baja eficacia en el proceso de captación carbonada (Taub, and Lerdau, 2000; Ghannoum *et al.*, 2005).

En todo caso, hay que indicar que el síndrome  $C_4$  no está vinculado a grupos taxonómicos determinados, existiendo especies de estas características en escalas botánicas muy diversas, y coexistiendo incluso en un mismo género plantas con características  $C_3$ ,  $C_4$  e, incluso, intermedias (Edwards, 2001). Varias de ellas son especies cultivadas de gran importancia económica. Algunas muestran una elevada aplicabilidad en programas de lucha frente a la desertización (sujeción de suelos en laderas de fuertes pendientes, estabilización de dunas, contención de soterramientos en las márgenes de pantanos), actualmente de gran interés como cortafuegos, y biotecnológico para su utilización como biocarburante etc. Otras tienen un elevadísimo papel bioindicador actual y paleoecológico; e, incluso, por sus características fenológicas, nutricionales y organolépticas, constituyen uno de los mejores recursos para la ganadería de zonas áridas y semiáridas. Todo ello avalado por la ya mencionada alta capacidad de desarrollo y favorable competencia con otro tipo de plantas (Hatch, 1992).

Las plantas producen centenares de compuestos volátiles que, por su rapidez de movimientos, pueden actuar como reguladores y coordinadores inmediatos del crecimiento y desarrollo de la propia planta e, incluso, de las adyacentes. Entre las fitohormonas, el etileno, muy activo biológicamente, interviene en todos los estados fenológicos de la planta, con multitud de acciones a lo largo de la evolución de la misma y de sus tejidos y órganos. Es producido, así mismo y resulta activo en animales, bacterias, hongos, algas, y plantas no vasculares, lo que nos da idea de la influencia y de las interacciones de que puede ser responsable en la ecología. El etileno regula, de forma natural, diversos procesos que pueden afectar a la fotosíntesis, como el tamaño del estoma, el ángulo foliar, la integridad de los cloroplastos y la actividad sumidero de tejidos y órganos, especialmente meristemos apicales, hojas y frutos. Esto conlleva a una disminución de la fotosíntesis y de la apertura estomática pero, en general, se duda de una acción directa sobre este proceso.

La aplicación de esta fitohormona a las plantas es desde hace muchos años, un procedimiento normal para obtener ventajas en el crecimiento y desarrollo de ellas. Aunque la práctica más común de esta actividad se ha centrado en la maduración de los frutos, son numerosas sus posibilidades y destaca entre ellas su intervención en el proceso de germinación de las semillas. Esta cualidad podría ser de gran importancia

en el establecimiento selectivo de especies autóctonas, para su implantación y desarrollo en las condiciones ambientales adversas ya descritas. Por otra parte, basándonos también en su capacidad de producir etileno, en la cuantía de tal producción y en la diferente sensibilidad de las distintas partes de las plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM para este proceso, sin duda, pensamos puede servir así mismo para su clasificación (Abeles, 1992).

Aunque existe un elevado número de especies  $C_4$  y CAM ya identificadas en distintos entornos geográficos, lo ideal desde el punto de vista ecológico y agronómico es la utilización, para tal menester, de especies autóctonas. En ese sentido, algunos países de alto desarrollo científico, y que poseen territorios con características mencionadas (Israel, USA, Rusia, Australia, etc.), hace años que emprendieron campañas de identificación de sus especies  $C_4$  y CAM (Hoffmann, 1994; Kalapos *et al.*, 1997; Pongraz, 1997; Pyankov *et al.*, 2000; Taub, 2000; Ghannoum, *et al.*, 2001; Wan and Sage, 2001.) Más aún, en distintos países cálidos de Asia, África y América, de bajo nivel de desarrollo, se han llevado a cabo activas campañas prospectivas, financiadas por grupos europeos y americanos pioneros en el estudio de este tipo de plantas (Teeri, 1982; Frey *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1990; Batanouny *et al.*, 1991; Das, and Vats, 1993; Glagoleva, and Chulanova, 1996; Young, 1998; Musil *et al.*, 2002). Por lo que respecta a nuestro país, existen trabajos publicados por el grupo de la Dra. Echevarría, de la Universidad de Sevilla, sobre la identificación de especies con anatomía Kranz en la zona del Odiel (Echevarría *et al.*, 1988 a; Echevarría *et al.*, 1988 b).

En dichos trabajos los autores sólo atienden a aspectos de identificación de las características citológicas de la hoja, lo que puede introducir elementos de indeterminación dada la existencia de especies en estadios de evolución de formas  $C_3$  a  $C_4$ . A ello no es ajeno el costo y tediosidad de algunas buenas técnicas usadas como elementos discriminadores, especialmente el cociente isotópico  $C_{12}/C_{13}$ , que requiere un espectrómetro de masas para isótopos estables ligeros de muy alto costo (Boutton *et al.*, 1983; Cerling, 1991; Pate, 2001). Independientemente de la disponibilidad de dicho equipamiento, ello reclama el diseño de nuevos métodos de diagnóstico apoyados en los recientes avances de la biología molecular, como es la detección mediante sondas específicas de proteína (enzimas), o de sus genes codificantes, específicos de las plantas  $C_4$  y CAM.

Si como, hemos visto, eran muy escasos los trabajos referentes a la documentación de plantas  $C_4$  y CAM presentes en nuestro país, más lo son aún —se diría que prácticamente inexistentes— los que inciden en aspectos climáticos, edafológicos, etc., de los nichos en que se ubican, y absolutamente inexistentes los que hacen referencia a la utilización de dichas especies en la rehabilitación de zonas áridas y semiáridas del entorno en que se encuentran (Elbassam, 1998). De ahí, la novedad y actualidad del tema, ya que, como en otros capítulos de este libro se indica, las nuevas tendencias de «reforestación» en zonas de recursos hídricos escasos, abandonan las plantaciones de árboles, haciendo énfasis en los recursos que la naturaleza tiene implantados en la zona (Hakansson, 1995).

## Objetivos concretos e interés de los mismos

Desde un enfoque global, pretendemos contribuir a las políticas de desarrollo económico, social y ecológico que hoy se buscan y, en general se promueven en el mundo mediante los paradigmas de sostenibilidad en el uso de los recursos.

El *Objetivo General* del trabajo se dirige a evaluar las posibilidades de las  $C_4$  y CAM en zonas áridas y semiáridas del mediterráneo español, como auxiliares técnicos en acciones de revalorización agroambiental y no es posible una respuesta convencional.

Estas plantas están adaptadas a ambientes de fuerte estrés hídrico. Se busca fortalecer nuestra capacidad de acción y conocimiento sobre recursos autóctonos poco exigentes en agua, factor limitante de muchas respuestas técnicas. El agua es el recurso más escaso en estas zonas áridas y semiáridas, y las acciones de revalorización-protección de tierras que se emprenden contando con su disposición (control de taludes en carreteras, rehabilitación de explotaciones mineras, mejoras de pastos, erosión, repoblación forestal de tierras en abandono, etc.), o fracasan tras las fases de instalación, o permanecen ligadas al apoyo de riegos. Riegos que, no sólo son caros y, por tanto, requieren subvención económica, sino que indirectamente fomentan la explotación de recursos fósiles (no renovables) o «falsean» las condiciones ecológicas del entorno que se pretende revalorizar (con elementos extraños al sistema natural dominante). En definitiva, prácticas que, cuando no han estado en oposición con la xericidad del medio, lo han estado con las expectativas más conservacionis-

tas, con las posibilidades de uso múltiple del territorio, o con la conservación del paisaje (Le Houérou, 1996). Dicho objetivo plantea un cambio conceptual en el empleo del agua para la rehabilitación de tierras áridas: *el agua que mejor se usa es aquella que se ahorra*.

Entre las acciones concretas a desarrollar dentro del trabajo se encuentran: aplicar nuevos elementos metodológicos de diagnóstico para poder documentar los recursos  $C_4$  y CAM de las zonas elegidas, basándonos indirectamente, en sus características botánicas y ecológicas y directamente, en las características fisiológicas, bioquímicas, inmunológicas y moleculares de las plantas.

## Elementos metodológicos de diagnóstico

Como toda investigación de tipo aplicado, la presente necesita el apoyo de estudios puntuales destinados a esclarecer aspectos críticos del estudio (muchas  $C_4$  y CAM aún no están identificadas o descritas). Hasta el momento, casi todos de los llevados a cabo sobre estas plantas han tenido un interés estrictamente científico, o han respondido a intereses agrícolas de relevancia económica. Esto ha llevado a subestimar la importancia práctica de metodologías de identificación que sean ágiles (Belea *et al.*, 1998). El presente trabajo tiene una fuerte participación en campo (con flora autóctona) y el desarrollo de metodologías rápidas, instrumentalmente transportables, y fácilmente transvasables a un paquete tecnológico, será una de las aportaciones más innovadoras del mismo. Estamos refiriéndonos al desarrollo de una metodología no costosa, rápida y sencilla, que permita abordar la identificación de especies  $C_4$  y CAM, basada en la puesta de manifiesto en estratos foliares de moléculas marcadas de este tipo de especies. Un candidato simple puede ser la piruvato ortofosfato dikinasa (PPDK), un enzima del metabolismo  $C_4$  y CAM, prácticamente inexistente en especies  $C_3$ . El desarrollo de métodos antigénicos y/o de sondas moleculares para su puesta de manifiesto puede ser determinante a este fin. (Rajeevan *et al.*, 1991).

Se ha operado sobre especies recolectadas, unas, en la zona de las quebradas de Gor (Granada) (*Salsola oppositifolia*, *Atriplex halimus*, *Euphorbia dentata*, *Retama sphaerocarpa*, *Andryala ragusina*) y otras en el Parque Natural de Cabo de Gata, y desierto de Tabernas (Almería) (*Mesembryanthemum crystallinum*, *Mesembryanthemum nudiflorum*, *Atriplex semibaccata*, *Salsola kali*, *Suaeda vera*, *Suaeda pruinosa*, *Calendula arvensis*,

*Zygophyllum fabago*, *Hordeum murinum*). De ellas, unas aparecían ya descritas como especies  $C_4$  o CAM en la bibliografía, otras eran, obviamente  $C_3$  y se programaron a efectos comparativos, mientras que otras no aparecían clasificadas claramente en uno u otro tipo.

Cuando se consideró procedente algunas de estas plántulas se enraizaron en el laboratorio en cámara botánica sobre vermiculita y turba, en condiciones de cultivo estándar (16/8 horas fotoperiodo, y 28/20 °C temperatura día/noche).

## Producción de etileno

Para determinar la producción de etileno, en cada caso, se recolectó una porción de la parte aérea de cada especie, encerrándose cada muestra, in situ, en un recipiente especial que permitía la acumulación del gas en estudio y muestrear el ambiente gaseoso del contenedor. Una alícuota del gas obtenida con jeringa se llevó al laboratorio para el análisis y cuantificación del mismo, mediante cromatografía de gases.

Algunos investigadores han estudiado la diferencia de respuesta en producción de etileno en condiciones de estrés, en plantas tipo  $C_3$  y  $C_4$  (Zhang and Kirkham 1995; Zhang and Kirkham, 1996). En nuestro caso, el propósito fue conocer las posibles diferencias en el desprendimiento de etileno por parte de plantas, que se desarrollan de forma natural en zonas áridas, con objeto de determinar si tal producción podría tener influencia en la implantación y desarrollo de las mismas en esas condiciones de aridez. A tal fin, temporalmente, se hicieron determinaciones de esta hormona, en diversas especies  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM a lo largo de diferentes estaciones del año, primavera, invierno y primavera siguiente. Los resultados expuestos son la media de seis determinaciones en cada caso.

Los valores determinados (Tabla 1) parecen definir diferencias señaladas entre las especies según el sistema fijador de  $CO_2$ , menores las de  $C_3$  y mayores pero similares las  $C_4$  y CAM. Pequeñas diferencias, así como algunas de las alteraciones encontradas, pueden deberse al distinto periodo de floración o fructificación de cada planta en la recogida, ya que se altera la producción de etileno, según las diversas fases de la ontogenia de las mismas. Por ello se recomienda, en caso de duda, una determinación sistemática en los diversos estados fenológicos de la planta: vegetativo, floración y fructificación.

TABLA 1

a) Producción de etileno  
( $\mu\text{l}$  etileno/g de peso seco/hora)

	Primavera	Invierno	Primavera
CAM- <i>Mesembrianthemum crystallinum</i>	2,36	0,75	1,58
CAM- <i>Mesembrianthemum nodiflorum</i>	2,83	1,89	2,68
Valores medios CAM	2,60	1,32	2,13
C4- <i>salsola Cali</i>	2,03		3,47
C4- <i>Salsola oppositifolia</i>		1,63	0,81
C4- <i>Salsola papillosa</i>			1,98
C4- <i>Sueda pruinosa</i>		1,98	1,25
C4- <i>Atriplex halimus</i>			2,25
C4- <i>Atriplex glauca</i>		1,63	1,93
C4- <i>Atriplex semibaccata</i>	1,97	1,98	2,15
Valores medios C <sub>4</sub>	2,00	1,86	1,98
C3- <i>Zygophyllum fabago</i>	1,55		
C3- <i>Suaeda vera</i>	1,76	1,50	3,36
C3- <i>Piptatherum miliaceus</i>			1,34
C3- <i>Salsola genistoides</i>			0,58
C3- <i>Sarcocornia fruticosa</i>		0,94	0,99
C3- <i>Ligeum sparticum</i>			1,04
C3- <i>Retama sphaerocarpha</i>		0,78	
Valores medios C <sub>3</sub>	1,66	1,22	1,53

b) Valores medios encontrados según el tipo de planta

	Primavera	Invierno
Plantas CAM	2,365	1,32
Plantas C <sub>4</sub>	1,99	1,86
Plantas C <sub>3</sub>	1,60	1,22

### Fotosíntesis neta

Las determinaciones de fotosíntesis neta se hicieron también in situ, sin separar la planta de su enraizamiento. Se utilizó un IRGA (LI-COR mod. 6200), de circuito cerrado, en condiciones naturales de iluminación y temperatura. Tanto en uno como en otro lugar de muestreo la iluminación osciló entre 1500 y 2000  $\mu\text{moles/m}^2/\text{seg}$  PAR, mientras que la temperatura se situó entre 20 y 30 °C. El principal problema se planteó al tener que introducir en la computadora del equipo la variable de superficie foliar de medida, dada la irregularidad y, sobre todo, la variabilidad interespe-

cífica del material foliar, unas veces con hojas excesivamente pequeñas para las cámaras disponibles, otras por ser las hojas no planas y, casi siempre, por la carnosidad de las mismas, un hecho habitual en las especies CAM. Se optó por introducir en el IRGA una estimación ponderada de la superficie foliar.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 2, donde se indican: especie, irradiación ( $\mu\text{moles/m}^2/\text{seg}$  PAR) y temperatura de medida (°C), superficie foliar estimada ( $\text{cm}^2$ ), y valor de fotosíntesis neta ( $\mu\text{moles de CO}_2$  asimilado/ $\text{m}^2/\text{seg}$ ). Se indica también si la especie ha sido descrita como C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> o CAM, así como el diagnóstico nuestro en función de los datos obtenidos.

TABLA 2

Resultados de fotosíntesis neta ( $\mu\text{moles de CO}_2/\text{m}^2/\text{seg.}$ )

Especie	PAR	$^{\circ}\text{C}$	$\text{cm}^2$	*PHOT.	Tipo
<i>Salsola oppositifolia</i>	1600-1825	21,9-29,8	1,0	23,06-12,66	$\text{C}_4$ (NADP-ME)
<i>Atriplex halimus</i>	1519	24,6	4,0	22,00-20,52	$\text{C}_4$ (ME)
<i>Euphorbia dentata</i>	1536-1850	28,9-29,0	1,5	8,89-10,65	$\text{C}_3$
<i>Retama sphaerocarpa</i>	1947-2034	29,3	1,0	13,70-11,38	$\text{C}_3$
<i>Andryala ragusina</i>	1764-1850	25,0-26,5	3,5	16,91	$\zeta\text{C}_4?$
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	1841	27,6	3,0	3,78-3,16	CAM
<i>Mesembryanthemum nudiflorum</i>	1989	29,0	6,9	3,00	CAM
<i>Atriplex semibaccata</i>	2000	27,0	2,6	1,47	$\zeta\text{CAM?}$
<i>Salsola kali</i>	1982	28,7	2,6	8,50	$\zeta\text{C}_4$ (NADP-ME)?
<i>Suaeda vera</i>	1910	26,8	2,0	8,81	$\text{C}_3$
<i>Suaeda pruinosa</i>	1900	26,7	2,0	14,15	$\zeta\text{C}_3\text{-C}_4?$
<i>Calendula arvensis</i>	1984	29,8	6,0	16,16	$\zeta\text{C}_3?$
<i>Zygophyllum fabago</i>	1634	29,0	2,5	4,25	$\zeta\text{CAM?}$
<i>Hordeum murinum</i>	1729	29,0	2,1	7,65	$\text{C}_3$

Los valores normales oscilan entre 8 y 12  $\mu\text{moles de CO}_2$  asimilados por  $\text{m}^2$  y seg., para las especies  $\text{C}_3$ , y entre 14 y 30 para las plantas  $\text{C}_4$ . En las especies de tipo CAM, por tener asimilación de  $\text{CO}_2$  sólo nocturna, los valores diurnos oscilan entre 0 y 5  $\mu\text{moles de CO}_2$  asimilados por  $\text{m}^2$  y seg.

De dichos resultados se sacan las siguientes conclusiones:

- Especies claramente  $\text{C}_3$ : *Euphorbia dentata*, *Retama sphaerocarpa*, *Suaeda vera* y *Hordeum murinum*.
- Especies claramente  $\text{C}_4$ : *Salsola oppositifolia* y *Atriplex halimus*.
- Especies claramente CAM: *Mesembryanthemum crystallinum* y *Mesembryanthemum nudiflorum*.
- Especies probablemente  $\text{C}_3$ : *Calendula arvensis*.
- Especies probablemente  $\text{C}_4$ : *Andryala ragusina* y *Salsola kali*.
- Especies probablemente CAM: *Atriplex semibaccata* y *Zygophyllum fabago*.
- Especies dudosas  $\text{C}_3\text{-C}_4$ : *Suaeda pruinosa*.

Algunas de estas especies ya han sido definidas en los tipos que se mencionan, apareciendo aquí confirmadas como tales. Por el contrario, otras no manifestaban esa identidad, mientras que otras más tienen una clasificación dudosa. Tanto en unas como en otras será necesario llevar a cabo medidas adicionales, así como cotejar con otros parámetros adicionales: anatomía foliar, discriminación isotópica, etc. Lo más notable de estos resultados es la ubicación preliminar, no descrita

con anterioridad, de la *Andryala ragusina* como especie  $\text{C}_4$ , y del *Atriplex semibaccata* y *Zygophyllum fabago* como potenciales especies CAM.

### Análisis enzimático

Para analizar los niveles enzimáticos, moleculares e inmunológicos se muestrearon ramas con abundante material foliar, o incluso plantas completas, que se transportaron al laboratorio en neveras portátiles a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se ha puesto a punto la metodología para el análisis de las siguientes enzimas, vinculadas al metabolismo  $\text{C}_4$  y CAM: NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH), NAD-malato deshidrogenasa (NAD-MDH), NADP-enzima málico (NADP-ME), NAD-enzima málico (NAD-ME), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina-aminotransferasa (Ala-AT), fosfoenolpiruvato-carboxilasa (PEP-Carb), fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEP-CK) y piruvato diquinasa (PDK), además de la determinación de clorofila foliar. Todas ellas se hicieron según reacciones enzimáticas ya descritas (Ashton *et al.*, 1990), medidas espectrofotométricas al UV, con excepción de la determinación de clorofila, al visible, que se llevaron a cabo sobre extractos foliares en un espectrofotómetro visible-UV Perkin-Elmer.

El principal inconveniente con que tropezamos fue, de nuevo, la heterogeneidad interespecífica del

TABLA 3

Actividades enzimáticas expresadas en  $\mu$ moles de sustrato transformado/ml de extracto/min.  
La concentración de clorofila en mg. de clorofila/g de peso fresco de hoja

Especie	NADPME	NADME	NADMDH	AspAT	PEPCarb	PEPCK	Clorofila
<i>M. crystallinum</i>				0,01	59,70	0,00	
<i>M. nudiflorum</i>	2,48	2,49	1317,30	62,20	13,20	2,94	0,279
<i>A. semibaccata</i>	24,80	45,98	749,80	68,42		10,14	0,772
<i>Salsola kali</i>	14,03	12,44	1098,75	17,42	9,95	22,39	0,279
<i>Suaeda vera</i>	1,49	0,99	932,07	31,10	4,98	74,76	0,240
<i>Suaeda pruinosa</i>	37,20	32,34	287,07	1057,40		95,58	0,468
<i>Z. fabago</i>	24,80	62,20	58,00	39,81		37,64	0,671
<i>Spinacia oleracea</i>	1,30	0,31	0,43		0,25	0,25	0,744
Valores medios en especies C <sub>4</sub>	(NADPME) 25,40	(NADME) 18-60	(NADME y PCK) 16-35		(todas) 15-35	(PCK) 5-15	

material foliar, que hacía que tests que iban bien para unas especies, fueran inviables para otras. La razón es la puesta en libertad de potenciales inhibidores enzimáticos —no sólo de la enzima a determinar, sino de las enzimas auxiliares usadas en los tests— que, inocuos en el tejido original por la compartimentación tisular, se ponen en libertad al homogenar para obtener los extractos. A la vista de ello, y con objeto de obtener resultados comparables, redujimos las determinaciones enzimáticas preseleccionadas, a las seis siguientes: NAD-MDH, NADP-ME, NAD-ME, Asp-AT, PEP-Carb y PEP-CK, amén de la medida de la clorofila foliar. En la Tabla 3 se recogen los resultados obtenidos para dichas enzimas, indicándose también los valores habituales entre especies C<sub>4</sub>.

De los resultados obtenidos, se deduciría, una posible condición del carácter CAM o C<sub>4</sub> del *Atriplex semibaccata*, *Salsola kali*, *Suaeda pruinosa* y *Zygophyllum fabago*, siendo claramente C<sub>3</sub> *Suaeda vera* y, por supuesto, *Spinacia oleracea*, usada aquí simplemente como testigo. Respecto a los *Mesembryanthemum crystallinum* y *nudiflorum*, descrita la primera como especie CAM, no podemos decir nada ni a favor ni en contra, por no haber encontrado hasta ahora valores considerados estándar en este tipo de especies. Sólo decir que los altos valores obtenidos en ambas especies para la enzima PEP-Carb, como sabemos aceptora primaria de CO<sub>2</sub> en C<sub>4</sub> y CAM, parece confirmar esa idea. Nos parece interesante recordar que se trata de especies bien adaptadas a ambientes xéricos, con altas tasas de fotosíntesis neta, lo que ocurre por circunstancias bioquímicas y anatómicas particulares (síndrome Kranz) (Sage, 2004).

Podemos decir que los elementos identificadores utilizados en general hasta ahora son:

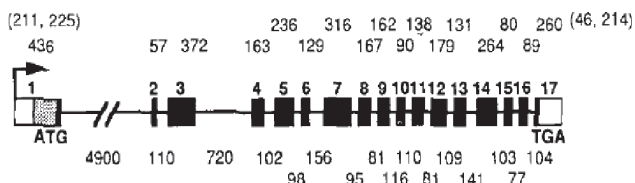
- *Producción de la fitohormona, etileno*, con valores sensiblemente menores de las C<sub>3</sub> entre 1,60 y 1,22 frente 1,99 y 1,86 de C<sub>4</sub>, y 2,37 y 1,32 de CAM en  $\mu$ l/g peso seco/hora, todas ellas en primavera la primera medida e invierno la segunda.
- *Alta fotosíntesis neta* (IRGA), entre 20 y 30  $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> asimilado/seg/m<sup>2</sup> de tejido foliar en las especies C<sub>4</sub>, frente a valores entre 8 y 12 en las especies C<sub>3</sub>.
- *Elevados niveles de algunas enzimas del metabolismo C<sub>4</sub>* (NADP-ME, NAD-ME, PEP-carboxilasa, etc.), frente a otras inferiores, o casi nulas (PPDK) en las especies C<sub>3</sub>.
- *Estructura simétrica tipo «Kranz» de la hoja en las C<sub>4</sub>*, frente a la asimétrica dorsiventral en las C<sub>3</sub> (microscopía óptica y electrónica).
- *Discriminación isotópica* (espectrometría de masas), con valores  $\delta^{13}$  entre -16 y -12 en las especies C<sub>4</sub>, y  $\delta^{13}$  entre -30 y -22 en las C<sub>3</sub>.

### Análisis molecular

Las determinaciones llevadas hasta ahora de este tipo son tediosas, y a veces con equipos costosos y complejos. Por ello decidimos desarrollar un método rápido y sencillo, de gran poder definidor, que nos permitiese obviar estas dificultades. Se trata de poner de manifiesto la presencia de un marcador molecular

característico de las especies  $C_4$  no presente en las plantas  $C_3$ . Como tal seleccionamos la enzima piruvato-ortofofosfato dikinasa (PPDK), que cataliza el paso de piruvato a fosfoenolpiruvato (P-enolpiruvato), el sustrato sobre el que se fija el  $CO_2$  atmosférico mediante la P-enolpiruvato carboxilasa.

## A



## B

### cyPPDK2

M A P A P C G R S S Q R V P H F G K G K  
ATGGCGCCCGCTCCATGTGGCCGTTCGTCGCAGAGGGTGTTCACCTTCGGCAAGGGCAAG  
C4PPDK ACGACCAAAAAGAGGGTGTTCACCTTCGGCAAGGGCAAG  
mature protein T T K K R V F H F G K G K

S E G N K N M K E L L G G K G A N L A E  
AGCGAGGGCAACAAGAACATGAAGGAGCTGCTGGGCGGCAAGGGCGGCAACCTGGCGGAG  
AGCGAGGGCAACAAGAACATGAAGGAGCTGCTGGGCGGCAAGGGCGGCAACCTGGCGGAG  
S E G N K T M K E L L G G K G A N L A E

M A S I G L S V P P G F T V S T E A C Q  
ATGGCGAGCATCGGGCTGTCCGTGCGCGCGGGGTTACGGTGTGACGGAGGCGTGCCAG  
ATGGCGAGCATCGGGCTGTCCGTGCGCGCGGGGTTACGGTGTGACGGAGGCGTGCCAG  
M A S I G L S V P P G F T V S T E A C Q

Q Y Q E A G R A L P P G L W A E V L D G  
CAGTACCAGGAGCGCGGGCGCGCCCTCCCGCGGGGCTCTGGGCGGAGGTCCTCGACGGC  
CAGTACCAGGAGCGCGGGGTCGCGCCCTCCCGCGGGGCTCTGGGCGGAGGTCCTCGACGGC  
Q Y Q D A G C A L P A G L W A E I V D G

L R W V E E Y M G A  
CTGCGGTGGGTGGAGGAGTACATGGGCGCC  
CTGCGGTGGGTGGAGGAGTACATGGGCGCC  
L Q W V E E Y M G A

**cypdkZm2**  
**C4PPdkZm1**

FIGURA 1. Reproducción del Dr. Jen Sheen en, «Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes» 1991. *The Plant Cell*, 225-245. American Society of Plant Physiologists.

Comparación de estructura y secuencia de genes de PPDK de *Zea mays* (maíz). A). Representación esquemática del gen C4PPDK, las cajas negras representan las regiones codificantes de los exones de la C4PPDK madura, las líneas representan los intrones de la misma secuencia de maíz. B). Comparación de las secuencias de los genes C4PPDK (cloroplastídico) y CyPPDK (citoplasmático) de maíz altamente homólogas, esta última sin péptido de tránsito (Matsuoka, 1988).

Se trata de una enzima compleja, un tetrámero de unos 95000 Da por subunidad, de mecanismo de acción y regulación complicada, cuyo gen codificante

exhibe hasta 20 intrones. El gen se encuentra presente en todas las especies, en sus dos isoformas citosólica y cloroplastídica (Figura 1), aunque sólo se exprese en las de tipo  $C_4$  y CAM, lo que se debe a la ausencia en las  $C_3$  de secuencias promotoras esenciales para la expresión y/o elementos reguladores tipo *trans* determinantes en el proceso de transcripción (Rosche *et al.*, 1994). Así pues, su utilidad a efectos diagnósticos estriba en la puesta de manifiesto de sus productos de transcripción (mRNA) y/o traducción (proteína).

Para trabajos posteriores se diseñaron estos diferentes nucleótidos sintéticos terminales y/o centrales correspondientes a la secuencia publicada del gen de la PPDK de maíz (Matsuoka, 1988).

568 CGGCATGATGGACACGGTGCTCAA  
1088 AACGCTCAGGGTGAGGATGTGGTT  
1530 AAGCTGCTATTCTGGTAAGGGC  
1615 GCATGACTTCCCACGCTGCTGTGGTCGCACGTTGGT  
2249 GATGCTTGGCTTCCGTGGGTGCAG  
2762 TGTGGAGAACCGGTGGAGAGCCTT

Los números con los que se designan, corresponden al número de la base de la secuencia en los que comienza cada fragmento.

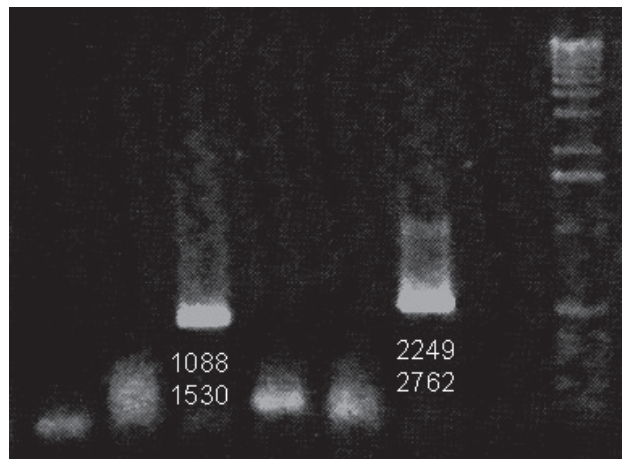


FIGURA 2. Amplificación por PCR de los fragmentos de secuencia 1088-1530 y 2249-2762, utilizando los oligonucleótidos correspondientes.

Por PCR (Mullis *et al.*, 1986) utilizando estos oligonucleótidos y como molde cDNA de maíz obtuvimos ocho fragmentos del mismo, que nos podrían servir como sondas para su potencial detección en otras especies  $C_4$ . Después de ensayos exploratorios, dos de ellos con unos 500 pares de bases, una vez marcados

con digoxigenina, mostraron una buena hibridación con el gen matriz (Figura 2). Uno de los mismos (entre las bases 1088 y 1530) fue seleccionado para los ensayos de reconocimiento con DNAs heterólogos de especies C<sub>4</sub> y CAM, hibridando perfectamente extractos génicos de distintas especies C<sub>4</sub> y CAM: *Salsola kali*, *Atriplex halimus*, *Zea mays*, *Mesembryanthemum crystallinum* (Figura 3), lo que indica el reconocimiento de los genes codificantes para sus correspondientes PPDks.

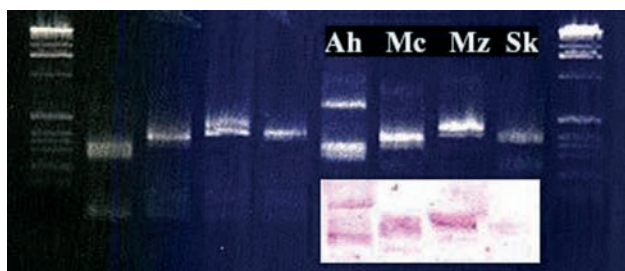


FIGURA 3. Desarrollo electroforético seguido de pase a membrana e hibridación de extractos génicos de distintas especies C<sub>4</sub> y CAM, *Atriplex halimus* (Ah) C<sub>4</sub>, *Mesembryanthemum crystallinum* (Mc) CAM, *Zea mays* Maíz (Mz) C<sub>4</sub> y *Salsola kali* (Sk) C<sub>4</sub> utilizando como sonda el fragmento 1088-1530 de maíz.

La utilización del fragmento 1088-1530 a efectos diagnósticos de plantas C<sub>4</sub> y CAM la basamos en una doble estrategia. Por un lado se lleva a cabo el aislamiento en la especie a prospectar de RNA total, del que por RT-PCR con los oligos anteriormente mencionados obtendremos un cDNA bruto. Alternativamente, aunque mas tedioso, si bien mas específico, podemos aislar del material foliar el mRNA total que, análogamente, por RT-PCR nos proporcionará un cDNA específico de PPDk. Finalmente, un Northern blot frente al fragmento del gen para la PPDk de maíz, aislado como más arriba se indica, permitirá definir la presencia del mRNA correspondiente al gen buscado.

Adicionalmente como test de bondad del método tenemos clonados dos grandes fragmentos del gen de maíz en el vector pGEM-T, los comprendidos entre las bases 568 y 1530, y 1530 y 2762, cuya secuenciación mostró completa homología con la publicada para maíz. (Matsuoka *et al.*, 1988).

### Análisis inmunológico

Otra vía puesta en marcha para el estudio prospectivo que estamos desarrollando, es la expresión heteró-

loga (*E. coli*) del gen de maíz, purificación al menos parcial de la correspondiente proteína expresada y a partir de ella obtener un suero anti-PPDK específico en conejo. De igual forma, este suero anti-PPDK también se puede obtener a partir de un péptido sintético específico.

El uso de péptidos sintéticos como inmunógenos se ha probado ya con éxito en la producción de anticuerpos para proteínas no caracterizadas. Una vez determinada la secuencia oligonucleotídica de un gen, fácilmente puede predecirse la de aminoácidos de la proteína codificada por ese gen. Péptidos seleccionados de esa secuencia pueden ser usados para la obtención de anticuerpos que pueden probar reacción cruzada con la proteína nativa.

Muchos anticuerpos han sido obtenidos por primera vez utilizando esta aproximación. Este método tiene algunas ventajas, los anticuerpos pueden ser específicos para determinadas áreas de una proteína y así probar funciones bioquímicas o bloquear determinadas actividades. Pueden ser generados igualmente anticuerpos específicos a miembros individuales de familias de proteínas, por selección cuidadosa de una secuencia de aminoácidos. En nuestro caso se han obtenido anticuerpos de péptidos cuyas secuencias son conservadas entre miembros de una familia de proteínas muy cercanas.

La conformación de nuestro péptido (Sigma-Genosys, Sigma-Aldrich Química) se determinó por di-croísmo circular y los resultados se correlacionaron con los de inmunoreactividad. Se observó que la capacidad de reconocimiento de anticuerpos por péptidos pequeños que imitan estructuras helicoidales mejoró con el agregado de cadenas no inmunogénicas en ambos extremos de los epítomos. Estas modificaciones mejoran la inmovilización sobre las superficies sólidas y permiten una mayor accesibilidad de los anticuerpos a los epítomos en solución.

Así pues, tanto ante la dificultad encontrada en la purificación y expresión de la proteína de maíz como de la poca identidad hallada entre ésta y las diferentes proteínas de las plantas C<sub>4</sub> y CAM autóctonas, decidimos hacer uso de un suero específico anti-PPDK a partir de un péptido sintético ANADTPDDALTARN que cumpliera ciertos requisitos. Este péptido es predominantemente hidrofílico, accesible, correspondiente a una zona antigénica de alta homología entre las secuencias de las PPDks conocidas (Imaizumi, 1997) y esta localizado entre la mitad y el C-terminal de la secuencia

de PPDK de maíz. Contiene tres giros beta predichos. Se conjugó específicamente a KLH en el N-terminal del péptido, haciendo uso de la química de EDC activado (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) (EDC o EDAC). En cualquier caso, un Western final (Towbin *et al.*, 1979, Traverso *et al.*, 2007) frente a un extracto foliar de nuestras plantas  $C_4$ , nos indicará la presencia de la enzima PPDK en las especies ensayadas.

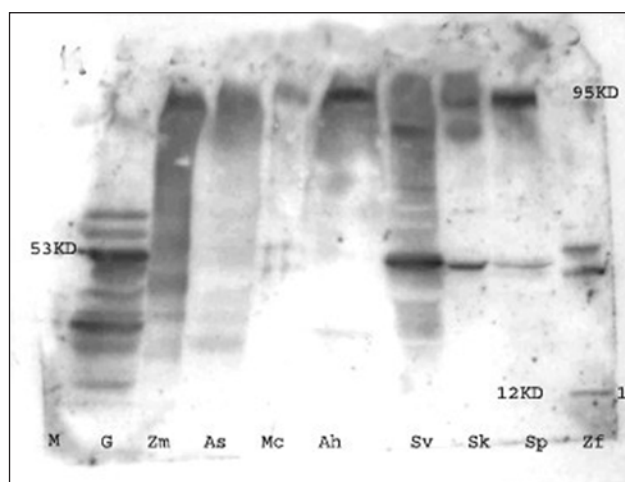


FIGURA 4. Inmunodetección por Western Blott de la enzima piruvato ortofosfato dikinasa (PPDK) de extractos foliares de distintas especies  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM, *Pisum sativum* (Guisante) (G)  $C_3$ , *Zea Mays* (Maiz) (Zm)  $C_4$ , *Atriplex semibacata* (As)  $C_4$ , *Mesembrianthemum cristalinum* (Mc) CAM, *Atriplex halimus* (Ah)  $C_4$ , *Sueda vera* (Sv)  $C_3$ , *Salsola kali* (Sk)  $C_4$ , *Sueda pruinosa* (Sp)  $C_4$  y *Zygophyllum fabago* (Zf)  $C_3$ .

En la figura 4 podemos ver diferentes bandas, obtenidas en el desarrollo electroforético y detectadas por el anticuerpo. Las de mayor peso molecular de 95 KD, pertenecen a la subunidad de la proteína tetramérica PPDK y se puede apreciar en el desarrollo electroforético de los diferentes extractos foliares de plantas de *Maiz* (Zm), *Atriplex semibacata* (As) *Atriplex halimus* (Ah), *Salsola kali* (Sk), y *Sueda pruinosa* (Sp) todas ellas pertenecientes al tipo  $C_4$  que como hemos dicho contienen la enzima piruvato-ortofosfato dikinasa (PPDK). Se puede apreciar la falta de bandas propias de la Rubisco dada la escasez de esta enzima en ellas. Igual ocurre con *Mesembrianthemum cristalinum* (Mc) planta CAM. Significa el reconocimiento en estas plantas de la expresión de esta proteína.

El desarrollo electroforético correspondiente a *Pisum sativum* (Guisante) (G), *Sueda vera* (Sv) y *Zygophyllum fabago* (Zf) pertenecientes al grupo de plantas  $C_3$ ,

no presentan la banda característica de la PPDK de 95KD, no obstante se observa a nivel medio del desarrollo electroforético bandas de (53 KD) propias de Rubisco en plantas  $C_3$ . Suponemos que estas bandas han sido detectadas por el anticuerpo anti PPDK dada la gran cantidad de Rubisco con la que cuentan estas plantas  $C_3$  (50 % de su proteína total en el cloroplasto) y además no estar optimizado el método tanto en la cantidad de extracto como de anticuerpo usados.

Podemos concluir, que la utilización del anticuerpo específico de la enzima PPDK a efectos de diagnóstico de plantas  $C_4$  y CAM, sirve para diferenciarlas de las plantas  $C_3$ .

## Conclusiones

En el plano organizativo de las investigaciones y cumplimiento del plan de trabajo hemos de destacar que continúan siendo superadas nuestras previsiones iniciales. Recuérdese que esta idea aborda un estudio prácticamente inédito, como es catalogar y documentar los recursos  $C_4$  y CAM de nuestra flora autóctona, acarreado colateralmente una puesta a punto, específica, de diversas metodologías al efecto. Esto está sirviendo para que unas se cotejen con otras, se calibren las más ajustables, se desechen las poco esclarecedoras y se decante uno o varios procedimientos de referencia.

Al presente, una de las conclusiones metodológicas que parecen poder establecerse (aunque sea de forma provisional) es la gran solidez de varios de los métodos, isotopía y su virtualidad para procesar gran número de muestras y los basados en biología molecular e inmunología. Las campañas de prospección y muestreo, en campo, continúan proporcionando aspectos interesantes, sobre conocidas, probables, e inciertas,  $C_4$  y CAM. Este material, del que se está recolectando también semillas para posteriores ensayos de germinación, sigue siendo la base muestral de los estudios analíticos comparativos (entre unas técnicas y otras) y todo él procede de un protocolo único, en idénticas condiciones fenológicas y estacionales.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido patrocinado por la Fundación Areces, Proyecto 2002-2005; Junta de Andalucía (Grupo CVI 154) 2004-2005; y Proyecto del Ministerio

de Ciencia y Tecnología BFI2002-00401. Gracias a Ana y compañía por cuantas veces nos abastecieron de muestras.

Queremos dedicárselo a Julio López Gorgé, pionero y entusiasta de estos trabajos con plantas C<sub>4</sub> y CAM. Siempre soñó Julio con llevar a cabo estas investigaciones que, partiendo de estudios básicos en el laboratorio, llegan a florecer en el campo para remediar tarde o temprano posibles necesidades primarias y básicas. Cuando salga a la luz este libro, esperamos te guste y sonrías.

## Referencias bibliográficas

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W. y SALTVEIT, M.E. Jr., 1992. «Ethylene in Plant». *Biology 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, Inc.*, New York (USA), 414 pp.
- ASHTON, ANTHONY R.; Burnell, James N.; FURBANK, Robert T.; COLIN, L.; JENKINS y MARSHALL, D. y HATCH, D. 1990. *Methods in Plant Biochemistry*, 3, 39-72.
- BATANOUNY, K.H.; STICHLER, W. y ZIEGLER, H., 1991. «Photosynthetic pathways and ecological distribution of Euphorbia species in Egypt». *Oecologia*, 87, 565-569.
- BELEA, A.; KISS, A.S. y GALBACS, Z., 1998. «New methods for determination of C-3, C-4 and CAM type plants». *Cereal Res.*, 26, 413-418.
- BOUTTON, T.W.; WONG, W.W.; HACHEY, D.L.; LEE, L.S.; CABRERA, M.P. y KLEIN, P.D., 1983. «Comparison of quartz and pyrex tubes for combustion of organic samples for stable carbon isotope analysis». *Analytical Chemistry*, 55, 1832-1833.
- CERLING, T.E., 1991. «Carbon dioxide in the atmosphere: evidence from cenozoic and mesozoic paleosols». *Am. J. Science*, 291, 377-400.
- DAS, V.S.R. y VATS, S.K., 1993. «A Himalayan monsoonal location exhibiting unusually high preponderance of C<sub>4</sub> grasses». *Photosynthetica*, 28, 91-97.
- ECHEVARRÍA, C.; MORILLA, A. y SERRANO, M., 1988a. «Cuatro nuevas especies con anatomía foliar tipo Kranz: *Salsola vermiculata*, L., *Cyperus capitatus* (Valdelli), *Sporobolus pungens* (Schreber) Kunth, and *Spartina densiflora* (Broun). *Lagascalia*, 15, 527-533.
- ECHEVARRÍA, C.; VAQUERO, I. y GU, F., 1988b. «Aportación al conocimiento del metabolismo fotosintético utilizado por cormofitas del Parque Natural de las Marismas del Odiel». *Lagascalia*, 15, 509-526.
- EDWARDS, G.E.; FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. y OSMOND, C.B., 2001. «What does it take to be C<sub>4</sub>? Lessons from the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis». *Plant Physiol.*, 125, 46-49.
- EHLERINGER, J.R., 1989. «Carbon isotope ratios and physiological processes in arid-land plants». In: «*Stable Isotopes in Ecological Research*» (Eds. P.W. Rundel, J.R. Ehleringer y K.A. Nagy) pp. 41-54.
- EHLERINGER, J.R.; CERLING, T.E. y HELLIKER, B.R., 1997. «C<sub>4</sub> photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub> and climate». *Oecologia*, 112, 285-299.
- ELBASSAM, N., 1998. «C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species as energy sources and their potential impact on environment and climate». *Renew. Energ.*, 15, 205-210.
- FREY, W.; KÜRSCHNER, H. y STICHLER, W., 1985. «Photosynthetic pathways and ecological distribution of halophytes from four littoral salt marshes (Egypt/Sinai, Saudi Arabia, Oman and Iran)». *Flora*, 177, 107-130.
- GHANNOUM, O.; VON CAEMMERER, S. y CONROY, J. P., 2001. «Carbon and water economy of Australian NAD-ME and NADP-ME C<sub>4</sub> grasses». *Aust. J. Plant Physiol.*, 28, 213-223.
- GHANNOUM, O.; EVANS, J.R.; CHOW WAH SOON; ANDREWS, T.J.; CON ROY, P.J.; VON CAEMMERER, S., 2005. «Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme C<sub>4</sub> grasses». *Plant Physiology* 137, 638-650.
- GLACOLEVA, T.A. y CHULANOVA, M.V., 1996. «Photosynthetic metabolism and assimilate translocation in C<sub>4</sub> halophytes inhabiting the Ararat valley. Rus». *J. Plant Physiol.*, 43, 349-357.
- HAKANSSON, S. Swes., 1995. «Weeds in agricultural crops. 3. Life forms, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis and plant families in a global perspective». *J. Agr. Res.*, 25, 163-171.
- HATCH, M.D., 1992. «C<sub>4</sub> photosynthesis. An unlikely process full of surprises». *Plant Cell Physiol.*, 33, 333-342.
- HOFFMANN, 1994. «Wild C<sub>4</sub> plants in Germany and Sweden. A compilation in view by climate change». *J. Angew. Bot.*, 68, 65-70.
- IMAIZUMI, N.; KU, M. S. B.; ISHIHARA, K.; SAMEJIMA, M.; KANEO, S. y MATSUOKA, M., 1997. «Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C<sub>3</sub> plant, and a comparison of structure and expression between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> genes for this protein». *Plant Mol. Biol.* 34, 701-716.
- KALAPOS, T.; BALOGHNÉ-NYAKAS, A. y CSONTOS, P., 1997. «Occurrence and ecological characteristics of C<sub>4</sub> dicot and Cyperaceae species in the Hungarian flora». *Photosynthetica*, 33, 227-240.
- LE HOUÉOU, H.N., 1996. «Drought-tolerant and water-efficient trees and shrubs for rehabilitation of tropical and subtropical Arid lands of Africa and Asia». *Land Husbandry*, 1(1-2), 43-64.
- MATSUOKA, M.; OZEKI, Y.; YAMAMOTO, N.; HIRANO, H.; KANO-MURAKAMI, Y. y TANAKA, Y., 1988. «Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence». *J. Biol. Chem.* 263, 11080-11083.
- MULLIS, K. B. y FALOONA, F. A., 1987. «Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction». *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- MUSIL, C.F.; CHIMPHANGO, S.B.M., y DAKORA, F.D., 2002. «Effects of elevated ultraviolet-B radiation of native and cultivated plants of Southern Africa». *Annals of Botany*, 90, 127-137.
- PATE, J.S., 2001. «Carbon Isotope Discrimination and Plant Water-Use Efficiency: Case Scenarios for C<sub>3</sub> Plants». In «*Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*» (Eds. M. Unkovich, J. Pate, A. McNeill, D.J. Gibbs) pp. 19-36. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture). USA.
- PONGRACZ, Rita, 1997. «Occurrence and ecological characteristics of C<sub>4</sub> and Cyperaceae species in the hungarian flora». (Lorand Eötvös University, Department of Plant Taxonomy and Ecology, H-1083 Budapest, Hungary).
- PYANKOV, V.I.; GUYIN, P.D.; TSOOG, S. y BLACK, C.C., 2000. «C<sub>4</sub> plants in the vegetation of Mongolia. Their natural

- occurrence and geographical distribution in relation to climate». *Oecologia*, 123, 15-31.
- RAJEEVAN, M.S.; BASSET, C.L. y HUGUES, D.W., 1991. «Isolation and characterization of cDNA clones for NADP-malate dehydrogenase from leaves of *Flaveria*. Transcript abundance distinguishes  $C_3$ ,  $C_3$ - $C_4$  and  $C_4$  photosynthetic types». *Plant Mol. Biol.*, 17, 371-383.
- ROSCHKE, E.; CHITTY, J.; WESTHOLFF, P. y WILLIAM, C. Taylor, 1994. «Analysis of Promoter activity for the Gene encoding Pyruvate Orthophosphate Dikinase in stably transformed  $C_4$  *Flaveria* species». *Plant Mol. Biol.* 26, 763-769.
- SAGE, R.F., 2004. «The evolution of  $C_4$  photosynthesis». *New Phytol.* 161, 341-370.
- TAUB, D.R. 2000. «Climate and U.S. distribution of  $C_4$  grass subfamilies and decarboxylation variants of  $C_4$  photosynthesis». *Amer. J. Bot.*, 87, 1211-1215.
- TAUB, D.R. y LERDAU, M.T., 2000. «Relationship between leaf nitrogen and photosynthetic rate for three NAD-ME and three NADP-ME  $C_4$  grasses». *Amer. J. Bot.*, 87, 412-417.
- TEERI, J. A., 1982. «Photosynthetic variation in the Crassulaceae». In *Crassulacean Acid* (Eds. I.P. Ting y M. Gibbs) pp. 244-259 (American Society of Plant Physiologists). USA.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. y GORDON, J., 1979. «Electroforetic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets- Procedure and some applications». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- TRAVERSO, J.A.; CAZALIS, R.; VIGNOLS, F.; SAHRAWY, M.; MEYER, Y., y CHUECA, A., 2007. «PsTRXh1 and PsTRXh2, are both Pea (*Pisum sativum*) h-type Thioredoxins with Antagonistic Behaviour in Redox Imbalances». *Plant Physiology* 143 300-311.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; PYANKOV, V.I. y EDWARDS, G.E., 1999. «Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsola (Chenopodiaceae)». *J. Exp. Bot.*, 50, 1779-1795.
- WAN, C.S.M. y SAGE, R.F. 2001. «Carbon and the distribution of  $C_4$  grasses along the Atlantic and Pacific coast of North America». *Can. J. Bot.*, 79, 474-486.
- WANG, X.C.; LUTTGE, U. y ZIEGLER, H., 1990. « $C_3$  plants and  $C_4$  plants of the xerophilic vegetation in the loess hills of the yellow River, Gansu province, NW China». *Bot. Acta*, 103, 93-96.
- YOUNG, H.J. y OUNG, T P., 1998. «Local distribution of  $C_3$  and  $C_4$  grasses in sites of overlap on Mount Kenya». *Photosynthetica*, 33, 227-240.
- ZHANG, J. y KIRKHAM, M.B. 1995. «Water relations of water-stressed, split-root  $C_4$  (*Sorghum bicolor*; Poaceae) and  $C_3$  (*Helianthus annuus*; Asteraceae) plants». *American Journal of Botany*, 82, 1220-1229.
- 1996. «Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings». *New Phytologist* 132, 361-373.

# La fosfoeno/piruvato carboxilasa (PEPC): enzima clave de los metabolismos fotosintéticos C<sub>4</sub> y CAM

CRISTINA ECHEVARRÍA\*, JOSÉ ANTONIO MONREAL,  
ANA BELÉN FERIA, EDUARDO TERCIO JIMÉNEZ,  
ARANCHA LEÓN, ROSARIO ÁLVAREZ  
y SOFÍA GARCÍA-MAURIÑO

## Resumen

La fosfoeno/piruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) cataliza la  $\beta$ -carboxilación del fosfoeno/piruvato (PEP) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir oxaloacetato (OAA) y Pi (Chollet *et al.*, 1996). La PEPC está ampliamente distribuida en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet *et al.*, 1996). En plantas vasculares su papel estelar está relacionado con la fotosíntesis C<sub>4</sub> y CAM («Crassulacean acid metabolism»), sin embargo desempeña otras funciones como la anaplerótica, en relación a la síntesis de proteínas, homeostasis del pH citosólico, electro-neutralidad y osmolaridad. Está formada por una pequeña familia multigénica algunos de cuyos representantes están regulados a nivel transcripcional por factores como luz, hormonas y metabolitos (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). La naturaleza alostérica de la enzima permite una regulación fina en relación a diferentes ambientes metabólicos. La PEPC está regulada por fosforilación reversible, proceso ligado a una cascada de transducción de señales de alta complejidad. En la actualidad es uno de los mejores modelos de señalización descritos en plantas. Este capítulo se centra en los eventos relacionados con este proceso en plantas C<sub>4</sub> y CAM, los dos sistemas mejor estudiados en la actualidad (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004; Nimmo, 2000; Vidal y Chollet, 1997).

## Summary

Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31, PEPC) catalyzes the  $\beta$ -carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) by  $\text{HCO}_3^-$  in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  to yield oxaloacetate and Pi (Chollet *et al.*, 1996). PEPC is a widely distributed enzyme in plants, green algae and micro-organisms but absent in yeast and animals (Chollet *et al.*, 1996). In higher plants, it catalyses a pivotal reaction related to such important processes as C<sub>4</sub> and Crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis, the anaplerotic pathway linked to amino acid synthesis, homeostasis of cytosolic pH, electroneutrality and osmolarity. PEPC belongs to a small multigenic family (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). At the transcriptional level, some PEPC genes respond to external and internal factors (light, hormones and metabolites), while at the

protein level, the allosteric nature of the enzyme allows its activity to be fine-tuned in relation to a varying metabolic environment. PEPC undergoes a posttranslational control by a phosphorylation process linked to a highly complex signal transduction cascade. Today, it is one of the best-described models of plant signaling. This chapter will focus on what is known about these processes in leaves of C<sub>4</sub> and CAM plants, the two systems that have been studied in detail so far (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004; Nimmo, 2000; Vidal y Chollet, 1997).

## Características generales

Las plantas de tipo C<sub>4</sub> poseen características anatómicas y bioquímicas que confieren lo que se conoce como el síndrome C<sub>4</sub>. Cabe destacar como hecho característico la inducción de la maquinaria fotosintética en la vaina vascular, un tipo de tejido que en las plantas C<sub>3</sub> no es fotosintético. La vaina vascular en las plantas C<sub>4</sub> desarrolla cloroplastos atípicos ricos en fotosistema I y que contienen la maquinaria necesaria para la asimilación del CO<sub>2</sub>, a saber, el ciclo de Calvin-Benson o ciclo C<sub>3</sub>. En contrapartida las células del mesófilo fotosintético pierden alguna de sus funciones fotosintéticas y desarrollan cloroplastos ricos en fotosistema II pero deficientes en Rubisco. Estas células se distribuyen formando una corona alrededor de la vaina dando lugar a la anatomía Kranz, típica de este tipo de plantas. El ciclo C<sub>4</sub> se desarrolla como vía de comunicación entre ambas células, y su fin último consiste en concentrar el CO<sub>2</sub> en las inmediaciones de la Rubisco para minimizar las pérdidas ocasionadas por la fotorrespiración (Hatch y Slack, 1970). A este hecho contribuye además la fuerte impermeabilización de la vaina a la difusión del CO<sub>2</sub>. Como consecuencia las concentraciones de CO<sub>2</sub> que se consiguen en la vaina están muy por encima (2000 ppm) de las concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosféricas (360 ppm). Los metabolitos principales

\* Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal). Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. de la Reina Mercedes nº 6. 41012, Sevilla, España.

Otra variante fotosintética en la que interviene el ciclo  $C_4$  es la que se da en las plantas CAM. En las plantas CAM se reproduce el mismo ciclo  $C_4$ ; sin embargo, la separación de las dos carboxilaciones es temporal. El málico producido vía PEPC se acumula en la vacuola durante la noche. Durante el día es descarboxilado. El  $CO_2$  desprendido provoca el cierre estomático, minimizando la pérdida de agua, y un aumento de la concentración de  $CO_2$  en las inmediaciones de la Rubisco eliminando la fotorrespiración. Finalmente, el  $CO_2$  es asimilado en el ciclo de Calvin-Benson. La eficiencia hídrica de las plantas CAM es aún mayor que la de las  $C_4$  (Smith y Winter, 1996).

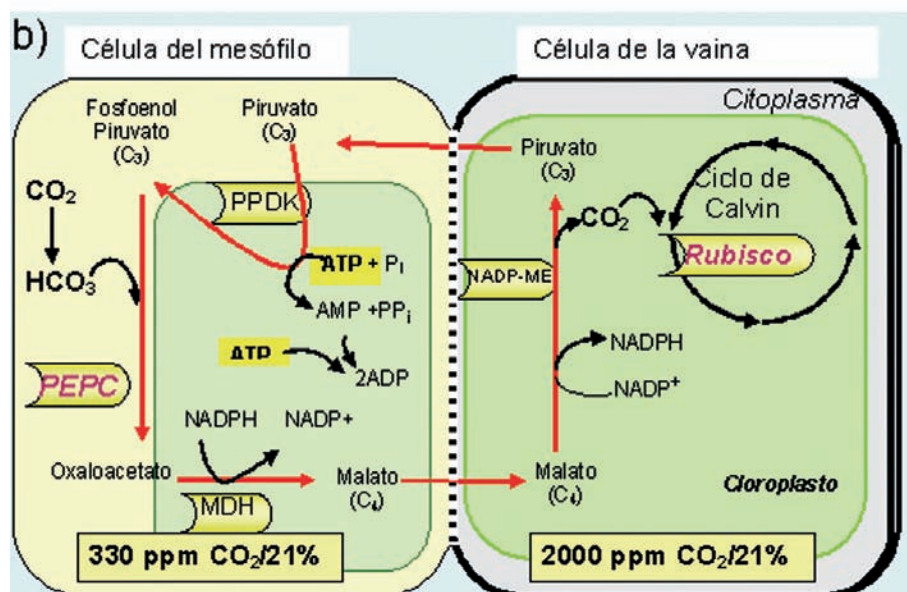
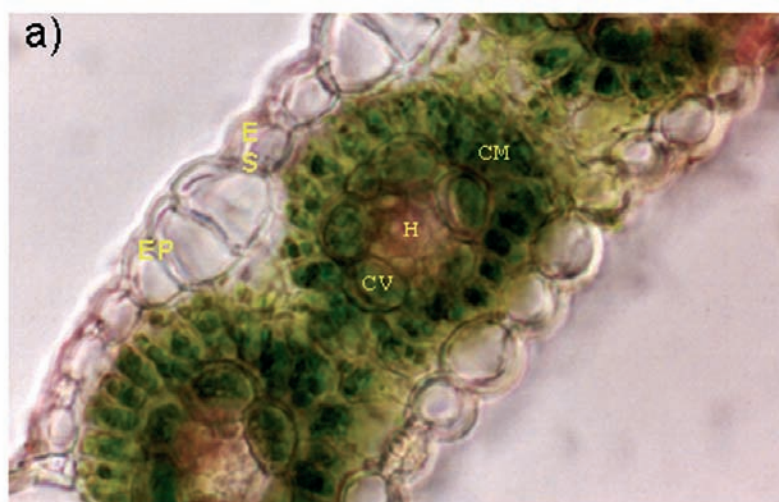


FIGURA 1: a) Corte transversal de una hoja de sorgo mostrando la anatomía Kranz; CM, célula del mesófilo; CV, célula de la vaina; H, haces vasculares; EP, epidermis, E, estoma. b) Ciclo  $C_4$  en una planta del tipo NADP-enzima málico (NADP-ME). Línea gruesa gris, pared celular gruesa e impermeable que impide la difusión de  $CO_2$  en las células de la vaina. PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; PPK, piruvato fosfato dikinasa. Los datos de concentración de  $CO_2$  son los estimados para cada tipo de célula.

Las plantas  $C_4$  y CAM constituyen una de las adaptaciones más complejas y representativas de los vegetales a condiciones de estrés (Sheen, 1999). Además, aquellas que son facultativas cambiando de metabolismo fotosintético  $C_3$  a CAM o a  $C_4$  en presencia de un factor ambiental estresante (baja concentración de  $CO_2$ , altas temperaturas, salinidad, fotoperiodo o condiciones nutritivas adversas), representan unos de los más singulares y mejor conocidos ejemplos de aclimatación (Hasegawa *et al.*, 2000; Lüttge, 2004).

En este capítulo profundizaremos en los aspectos relacionados con la regulación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa fotosintética (PEPC) y en concreto en su regulación postraduccional por fosforilación reversible.

### La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de  $HCO_3^-$  y  $Mg^{2+}$ , para producir oxaloacetato (OAA) y Pi (Chollet *et al.*, 1996). La PEPC fue caracterizada por primera vez en hojas de espinaca en 1953, considerándose durante mucho tiempo como una carboxilasa de plantas con función secundaria con respecto a la Rubisco (Bandurski y Greiner, 1953). Sin embargo, el descubrimiento de la fotosíntesis  $C_4$  y la implicación de una isoenzima específica de PEPC en esta ruta, aumentaron considerablemente el interés por esta enzima. Además de su implicación en este contexto fotosintético, la PEPC tiene una multiplicidad de funciones en la célula. Debido a la baja  $K_m$  por el sustrato bicarbonato (en el rango de  $\mu$ molar) esta enzima interviene, como función general, en la economía del carbono de la célula recapturando el  $CO_2$  respiratorio. Como funciones específicas se le asignan una función anaplerótica, la regulación del pH celular, interviene en la fijación de nitrógeno en leguminosas, en la absorción y transporte de cationes, en el movimiento estomático y en la interacción del tubo polínico y el estilo (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui, 2004). También ha sido implicada en la maduración y germinación de la semilla (Osuna *et al.*, 1996, 1999; González *et al.*, 1998, Izui, 2004) y en la maduración del fruto (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui, 2004).

Para satisfacer esta multiplicidad de funciones la PEPC está formada por una familia multigénica que codifica diferentes isoenzimas. En *Sorghum vulgare*, por

ejemplo, está representada por *SvC3*, PEPC constitutiva de Tipo- $C_3$ ; *SvC4*, PEPC fotosintética de Tipo  $C_4$ ; y *SvC3RI*, PEPC de raíz, inducible de Tipo  $C_3$  (Crétin *et al.*, 1991). Recientemente se ha descrito la existencia de una PEPC de tipo bacteriano en *Arabidopsis thaliana* y arroz (Sánchez y Cejudo, 2003).

La PEPC es una enzima citosólica ampliamente distribuida en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet *et al.*, 1996). Se organiza como un homotetrámero con subunidades de aproximadamente 110 kDa (Chollet *et al.*, 1996). La estructura tridimensional de la PEPC de *E. coli* y maíz muestra que las cuatro subunidades se organizan en un dímero de dímeros y que todos los determinantes estructurales importantes son semejantes entre las dos enzimas (Matsumura *et al.*, 2002), con la notable diferencia de la adquisición de un dominio de fosforilación en las PEPC eucariotas que está ausente en la PEPC bacteriana (Sánchez y Cejudo 2003; Vidal y Chollet, 1997). Esta adquisición ha resultado ser de gran importancia ya que las PEPC de plantas están fuertemente reguladas por fosforilación reversible (Bakrim *et al.*, 1993; Echevarría y Vidal, 2003). También existen diferencias importantes entre la isoenzima fotosintética (tipo  $C_4$ ) y las isoenzimas de tipo  $C_3$ . Uno de los requerimientos básicos que están en la base de las diferencias cinéticas de estas isoenzimas es poseer una Ser situada en la posición 774 en la PEPC- $C_4$ , que en la PEPC- $C_3$  es una Ala (Bläsing *et al.*, 2000). Además, el segmento 296-437 (301-442 en maíz) es también un determinante crítico que caracteriza a las PEPC  $C_4$  (Izui *et al.*, 2004).

### Regulación postraduccional de la PEPC

La coordinación entre el ciclo  $C_4$  y el ciclo de Calvin-Benson (ciclo  $C_3$ ) exige una fuerte regulación de la actividad de sus enzimas carboxiladoras. La PEPC está regulada a nivel transcripcional por diferentes factores entre los que destacan la luz, factores de estrés (salinidad, estrés hídrico, nutricional), hormonas (ABA y citoquininas) y fotoperiodo (revisado en Echevarría *et al.*, 2004). Sin embargo, en este capítulo nos centraremos en la regulación postraduccional de la PEPC profundizando en su mecanismo de regulación por fosforilación reversible y en algunos de los aspectos novedosos que conciernen a la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PPCK), así como a los elementos de

la cadena de transducción de señales que opera para la síntesis/activación de esta enzima.

La PEPC está sujeta a regulación alostérica. En plantas dicotiledóneas, la PEPC se activa por glucosa 6-fosfato (G6P) y se inhibe por L-Malato o Aspartato (Asp). En plantas monocotiledóneas, además de éstos, la Glicina o la Alanina son activadores (Chollet *et al.*, 1996; Izui *et al.*, 2004). El L-malato interacciona con la enzima en diferentes puntos, produciendo una inhibición competitiva, no competitiva o mixta dependiendo del pH, de la concentración y del estado de fosforilación de la PEPC (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994). La G6P incrementa la  $V_{\max}$  de la PEPC produciendo una bajada de la  $K_m$  para el PEP y disminuye el efecto inhibitor del malato (Chollet *et al.*, 1996). Tanto la actividad catalítica como el control metabólico son altamente dependientes del pH, especialmente cuando se ensaya a valores subóptimos de 7,1 a 7,3 (Echevarría *et al.*, 1994); así, la afinidad de la enzima por PEP y  $Mg^{2+}$  aumenta fuertemente entre pH 7 y 8. El pH óptimo de la actividad de la enzima ensayada in vitro es de 8.

La PEPC  $C_4$  evolucionó a partir de isoenzimas ancestrales  $C_3$  durante la evolución de las angiospermas, adquiriendo propiedades cinéticas y de regulación distintas a las de las isoenzimas  $C_3$ . Así, para la isoenzima fotosintética  $C_4$  de maíz encontramos valores de  $K_m$  para PEP,  $Mg^{2+}$ , y  $HCO_3^-$  a pH 7,3 de 30, 10 y 2 veces superiores a los de la forma  $C_3$ , respectivamente (Dong *et al.*, 1998).

La regulación de la actividad de la PEPC está influenciada por el estado oligomérico de la enzima, siendo el tetrámero la conformación óptima, seguida del dímero, y con un monómero inactivo. Los cambios en el estado de oligomerización están propiciados por factores como dilución de la enzima, concentración de sales en el medio de ensayo, concentración de L-Malato o baja temperatura (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, la contribución real de esta regulación a la actividad de la enzima in vivo no está clara en plantas  $C_4$ . Por el contrario, en plantas CAM hay evidencias de que el tetrámero actuaría durante la fase nocturna asociado a la fase activa de fijación de  $CO_2$  (Chollet *et al.*, 1996).

La abundancia de cisteínas en la PEPC (7, en posiciones altamente conservadas) hace pensar que la actividad de la PEPC podría estar influenciada por el estado redox de la enzima (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna cascada de óxido/reducción tipo ferredoxina/tiorredoxina

implicada en la regulación de la PEPC (Chollet *et al.*, 1996). En otro sentido, recientemente se ha descrito que productos como DTT, mercaptoetanol, o glutatión reducido, cambian débilmente la sensibilidad de la PEPC  $C_4$  al malato in situ (Pierre *et al.*, 2004). Sin embargo, ninguno de estos componentes tiene efecto in vitro. El efecto observado no se debe a ningún proceso mediado por tiorredoxina o dependiente de fosforilación; sin embargo, debido a que el glutatión es un compuesto fisiológico que se encuentra en el citosol principalmente en estado reducido, los autores proponen una posible contribución de este compuesto tiólico a la protección de la enzima frente al málico (Pierre *et al.*, 2004).

### Regulación de la PEPC por fosforilación reversible

La fosforilación reversible de la PEPC fotosintética se puso de manifiesto en *Bryophyllum* y maíz, plantas CAM y  $C_4$  respectivamente (Chollet *et al.*, 1996). Estudios posteriores pusieron de manifiesto que la fosforilación de la PEPC depende de luz en plantas  $C_4$  (Echevarría *et al.*, 1990) y de un oscilador circadiano aún sin identificar en plantas CAM (Nimmo, 2000). En cualquiera de estos casos la fosforilación de la PEPC está asociada a la etapa activa de fijación de  $CO_2$ . Es un mecanismo sinérgico que altera la regulación metabólica de sus efectores negativos, L-Malato, y positivo, G6P, y la respuesta al pH (Echevarría *et al.*, 1994). La PEPC fosforilada es menos sensible a málico, responde mejor a G6P y es más eficaz a pH subóptimo pero fisiológico de 7 y 7,3 (Echevarría y Vidal, 2003).

La fosforilación de la PEPC se produce en un único residuo de serina (Ser), localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La Ser fosforilable reside en el motivo E/DR/KxxS\*IDAQL/MR, común a todas las enzimas de plantas secuenciadas hasta la fecha, pero ausente en las PEPC de cianobacterias y en la PEPC de tipo bacteriano de plantas (Chollet *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2003). Este hecho sugiere que la regulación de la enzima por fosforilación ocurre en los múltiples y diversos contextos fisiológicos donde la PEPC está involucrada.

Los estudios de mutagénesis dirigida sobre una PEPC  $C_4$  recombinante de sorgo, pusieron de manifiesto que el efecto de la fosforilación puede ser simulado por la introducción de una carga negativa, sustituyendo

el residuo de serina por aspartato (S8D) en el extremo N-terminal de la proteína. La incorporación de una carga negativa en dicho dominio se traduce en un aumento de la velocidad catalítica y una disminución de la sensibilidad al L-Malato (Chollet *et al.*, 1996). La modificación de las propiedades funcionales de la PEPC también se consigue por la unión a la PEPC de anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo N-terminal, que contiene la secuencia del sitio de fosforilación de la enzima C<sub>4</sub> de hojas de sorgo, denominados APS-IgG (Pacquit *et al.*, 1995). Estos anticuerpos imprimen una distorsión en la molécula que simula la fosforilación (Pacquit *et al.*, 1995). Otros tratamientos como la sustitución de un residuo básico situado tres aminoácidos antes de la Ser por Asn, o la eliminación del péptido N-terminal de la PEPC-C<sub>4</sub> de maíz con enteroquinasa mimetizan parcialmente el efecto de la fosforilación (Izui *et al.*, 2004).

### La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PPCK)

La fosforilación de la PEPC la realiza una proteína quinasa llamada PEPC-quinasa (PPCK). La PPCK es altamente específica, pertenece a la familia de las quinasas Ca<sup>2+</sup>/calmodulina dependientes (CDPK) aunque no posee ninguna extensión N-terminal ni C-terminal que contenga motivos de regulación como sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> o secuencia autoinhibidora; también carece de motivos de fosforilación. Su actividad es independiente de Ca<sup>2+</sup>, y es la proteína quinasa más pequeña conocida hasta la fecha con un peso molecular de 32 kDa (Hartwell *et al.*, 1999). Es la primera quinasa descrita cuya regulación se produce por cambios rápidos en su velocidad de síntesis, con una velocidad de recambio de 2 h (Hartwell *et al.*, 1999; Jiao *et al.*, 1991). Las PEPC-quinasa de *Flaveria* y de *M. crystallinum* contienen una secuencia específica (GAA, ATAGAT y elementos GTA) en la región 3' no codificante, determinantes para los ARNm de vida corta, por lo que se les supone una tasa de recambio rápida para el ARNm (Tsuchida *et al.*, 2001).

Las primeras PEPC-quinasas se clonaron a partir de *Kalanchoe fedtschenkoi* y *Arabidopsis* en 1999 (Hartwell *et al.*, 1999). En la actualidad se sabe que la PEPC-quinasa está codificada por una pequeña familia de genes (Hartwell *et al.*, 1999; Nimmo, 2003; Shenton *et*

*al.*, 2006). El genoma de *Arabidopsis* posee dos genes de PEPC-quinasa, *PPCK1* y *PPCK2*, siendo *PPCK1* el que se expresa de forma más abundante en las hojas de la roseta (Fontaine *et al.*, 2002; Nimmo, 2003). En tomate, la expresión de *PPCK2* aumenta considerablemente durante la maduración del fruto (Marsh *et al.*, 2003). También se han encontrado representantes de estas dos isoenzimas en berenjena y tabaco (Marsh *et al.*, 2003) y en *F. trinervia* (Nimmo *et al.*, 2003; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004). En soja se han identificado cuatro representantes de *PPCK* (Sullivan *et al.*, 2004). Dos de las isoformas (*GmPPCK2* y *GmPPCK3*) se expresan preferentemente en el nódulo dependiendo del aporte de fotosintatos desde la raíz (Sullivan *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003, 2007).

Los productos de la traducción de los ADNc de los genes *PPCK* constan de 274-307 residuos de aminoácidos, y poseen una masa molecular de 31-33 kDa. Al alinear secuencias de PEPC-quinasa, se observa que los subdominios IV, V y VIA son muy variables mientras que los X y XI están muy conservados y son característicos de esta enzima (Izui *et al.*, 2004).

En especies C<sub>4</sub> se han identificado varios representantes de PEPC-quinasa. En *F. trinervia* se ha identificado un gen *PPCK* que se expresa fuertemente en hojas en respuesta a la luz (Tsuchida *et al.*, 2001), mientras que su expresión en otros tejidos es muy escasa, por lo que se cree que este gen codifica la PPCK C<sub>4</sub> que fosforila a la PEPC fotosintética (Shenton *et al.*, 2006). En maíz se han identificado cuatro genes que codifican para PPCK, denominados *ZmPPCK1-4* (Shenton *et al.*, 2006). *ZmPPCK1* se expresa preferentemente en respuesta a luz en las células del mesófilo de hojas, mientras que *ZmPPCK2* se expresa en luz y oscuridad en células de la vaina y no parece estar sometido a regulación circadiana. Los otros dos genes de *PPCK* de maíz se expresan en menor nivel y en otros tejidos de la planta (Shenton *et al.*, 2006). En sorgo, se han descrito *SbPPCK1* y *SbPPCK2*, equivalentes a *ZmPPCK1* y *ZmPPCK2*. Las proteínas PPCK1 y PPCK2 de sorgo poseen un 92 % y un 90% de identidad de aminoácidos con las quinasas 1 y 2 de maíz respectivamente. Además, la expresión de *SbPPCK1* aumenta de forma drástica en respuesta a luz, mientras que la respuesta de *SbPPCK2* a los cambios luz/oscuridad es menor. Estos resultados muestran que los genes *ZmPPCK1* y *SbPPCK1* codificarían para la PPCK1, que estaría considerada como la PPCK fotosintética que opera en el ciclo C<sub>4</sub> (Shenton *et al.*, 2006). Las proteínas PPCK2

y 3 de maíz y la 2 de sorgo son muy parecidas entre sí, y se diferencian del resto de miembros de la familia PEPC-quinasa en que contienen una inserción ácida de longitud variable entre el dominio VIb y VII del dominio catalítico quinasa (Shenton *et al.*, 2006).

### **Cadena de transducción de señales que conduce a la síntesis/activación de la PEPC-quinasa**

La PEPC-quinasa está regulada principalmente a nivel transcripcional (Hartwell *et al.*, 1999). En plantas  $C_4$ , la PEPC-quinasa se activa durante el día en respuesta a una alta intensidad luminosa, a través de una cadena de transducción de señales de la que se conocen numerosos componentes (Coursol *et al.*, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). En plantas CAM, la síntesis de la PEPC-quinasa depende de un oscilador circadiano que actúa en conjunción con el malato (Nimmo, 2000). En el caso de las plantas CAM, el L-Malato se libera de la vacuola al citosol durante el día, disminuyendo la expresión del gen *PPCK*, la actividad PEPC-quinasa y el estado de fosforilación de la PEPC, proceso que se revierte en oscuridad (Bakrim *et al.*, 2001) siguiendo un ritmo circadiano (Nimmo, 2000 y 2003).

La cinética de aparición de la actividad *PPCK* en la hoja de maíz (planta  $C_4$ ) es relativamente lenta, con un máximo de actividad después de 90 min de iluminación (Echevarría *et al.*, 1990). La inhibición de este proceso por CHX sugiere la implicación de una neosíntesis de la enzima como elemento de la cadena de transducción que conduce a la fosforilación de la PEPC *in vivo* (Hartwell *et al.*, 1999; Jiao *et al.*, 1991) o *in situ*, en los protoplastos de células del mesófilo de *Digitaria* (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996).

La fotoactivación de la PEPC-quinasa  $C_4$  está mediada por la fotosíntesis, ya que se inhibe en presencia de inhibidores del flujo fotosintético de electrones (DCMU), de desacoplantes y también de inhibidores del ciclo de Calvin (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Vidal y Chollet, 1997). Resultados obtenidos en protoplastos de células del mesófilo ponen de manifiesto que la basificación del pH y la presencia de  $Ca^{2+}$  son elementos indispensables para la fotoinducción de la actividad PEPC-quinasa, así como para la fosforilación *in situ* de la PEPC. En este sentido, se ha sugerido que el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) es el

metabolito mensajero que produce la regulación positiva de la quinasa en plantas  $C_4$  (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). En las hojas  $C_4$  iluminadas, este metabolito es producido en el ciclo de Calvin en los cloroplastos de las células de la vaina y difunde a las células vecinas del mesófilo, donde se transporta al cloroplasto en su forma parcialmente protonada. Existen evidencias que apoyan que este proceso de bombeo de protones, y la consecuente alcalinización del citosol es, de hecho, lo que dispara la transducción de señales para la síntesis de la quinasa en las células del mesófilo  $C_4$  (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). La secuencia de acontecimientos de esta cadena de transducción de señales en hojas  $C_4$  implicaría los siguientes elementos: i) la luz, a una intensidad luminosa superior a  $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ; ii) el 3-PGA, producido en el ciclo de Calvin y que es transportado al mesófilo actuando como mensajero intercelular; iii) la basificación del pH citosólico; iv) la participación de una fosfolipasa C dependiente de inositol (PI-PLC) (Coursol *et al.*, 2000) y producción de inositol trifosfato ( $IP_3$ ); v) apertura de canales de  $Ca^{2+}$  del tonoplasto (sensibles a TMB8) y activación de una quinasa  $Ca^{2+}$ -dependiente (inhibida por W7), con características de proteína quinasa C (PKC) (Coursol *et al.*, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 2004); vi) síntesis de la PEPC-quinasa; vii) fosforilación de la PEPC, hecho a su vez modulado por una regulación metabólica (L-malato y G6P) y por el pH (Echevarría *et al.*, 1994). Además, resultados recientes de nuestro grupo han mostrado que en la cadena de transducción de señales hay otra fosfatasa implicada (datos no publicados). Esta fosfatasa sería de tipo 2B o 2C, ya que no es sensible al ácido okadáico ni a la microcistina-LR (inhibidores específicos de PP2A).

Según estudios realizados en protoplastos y hojas de *M. crystallinum*, existe una cascada de transducción similar a la de plantas  $C_4$  en plantas CAM (Bakrim *et al.*, 2001; Taybi *et al.*, 1999). En ellas, el incremento de pH desencadenante de la señalización, que permitiría la expresión del gen *PPCK*, sería el resultado del transporte de ácido málico a la vacuola durante la noche. Cuando el malato se libera de la vacuola al citosol durante el día, la expresión y actividad de la quinasa y el estado de fosforilación de la PEPC disminuyen (Coursol *et al.*, 2000; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). En las plantas CAM, el malato producido por la PEPC citosólica durante la noche se transporta activamente a la vacuola. Este transporte se

realiza por ATP-*asas* de H<sup>+</sup> del tonoplasto que establecen un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> a través de la membrana cuando los protones son bombeados a la vacuola (Cushman y Bohnert, 1999). Puede ser que este proceso produzca la alcalinización del citosol en las células del mesófilo de hojas CAM. Apoyando esto, se ha visto que el pH citosólico del mesófilo en la planta CAM *Kalanchoe daigremontiana* aumenta aproximadamente en 0,3 unidades durante la última fase día/principio de oscuridad.

Los metabolitos, además de regular la síntesis en plantas CAM (Nimmo, 2003), también tienen efectos en algunas plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Por ejemplo, plantas de tabaco a las que se les suministra malato por corriente transpiratoria, reducen los niveles de actividad y de transcritos de la nitrato reductasa, que a su vez están coordinados con los de PEPC y PEPC-quinasa (Nimmo, 2003). En nódulos, el gen de *PPCK* se expresa en función de los fotosintatos translocados por la hoja, siendo la PEPC fosforilada durante el ciclo de luz, coincidiendo con el mayor aporte de fotosintatos (Nimmo, 2003; Xu *et al.*, 2003).

Numerosos estudios realizados en hojas de plantas C<sub>3</sub> y en órganos no fotosintéticos indican que en estas plantas y órganos C<sub>3</sub>, la activación de la *PPCK* también ocurre por síntesis proteica a través de una cadena de señalización que comparte numerosos elementos con la descrita en las plantas C<sub>4</sub> y CAM, con la notable excepción de la activación de la *PPCK* de semillas de trigo y cebada durante la germinación (Osuna *et al.*, 1999). Así, en protoplastos de células del mesófilo de *Arabidopsis* se ha comprobado que la expresión de *PPCK1* (la *PPCK* específica de la roseta) se activa por luz e implica el ciclo de los fosfoinosítidos, flujos de calcio desde la vacuola al citosol, y la regulación positiva de la PEPC-quinasa mediante el aumento en la tasa de renovación (Gousset-Dupont *et al.*, 2005). Además, esta cascada es dependiente de fotosíntesis. Sin embargo, en plantas y órganos C<sub>3</sub> se han descrito algunas variantes. Por ejemplo, en hojas cortadas de tabaco, el aumento de actividad PEPC-quinasa se bloquea por inhibidores de la fotosíntesis y por CHX, pero también por inhibidores de la glutamina sintetasa (Li *et al.*, 1996). Esta inhibición se revierte parcial y específicamente al aplicar glutamina exógena a las hojas, lo que induce a los autores a concluir que la *PPCK* se activa por luz en plantas C<sub>3</sub> mediante una ruta similar, pero no idéntica, a la que ocurre en maíz. En protoplastos del mesófilo de cebada, se ha observa-

do que la fosforilación de la PEPC dependiente de luz se modula por síntesis proteica y por calcio, sin embargo, esto ocurre sin una fluctuación asociada de los niveles de PEPC-quinasa, que se detecta siempre (Smith *et al.*, 1996). Otra variante importante es la definida por nuestro grupo. En trabajos realizados con semillas de trigo y cebada hemos puesto de manifiesto la fosforilación de la PEPC durante la germinación. Sin embargo la activación de la *PPCK*, inactiva en la semilla seca, no se produce por síntesis proteica (Osuna *et al.*, 1996 y 1999) sino por un aumento en la relación G6P/malato que se produce en las primeras horas de la germinación (Feria *et al.*, 2005).

Recientemente, los trabajos de Sullivan *et al.* (2004) describen un gen de *PPCK* de soja (*PPCK4*), una planta C<sub>3</sub>, que se regula de forma circadiana en hojas pero no en raíces. Comprueban que el gen del reloj circadiano *LHY/CCA1* se expresa tanto en hojas como en raíces siguiendo el ciclo normal, lo que indica que el reloj funciona en ambos órganos, pero sólo está conectado a la expresión del gen *PPCK4* en las hojas. En este trabajo se describe por primera vez la expresión de un gen *PPCK* bajo un control circadiano en una planta que no es CAM y, además, ese control es dependiente del órgano de la planta (Sullivan *et al.*, 2004 y 2005).

Finalmente, en arroz, se ha descrito recientemente un nuevo mecanismo en el control de la expresión de uno de los genes de *PPCK*, en concreto *OsPPCK2*. Este mecanismo se ha llamado iniciación alternativa de la transcripción, y consiste en la expresión de dos transcritos distintos a partir del mismo gen (Fukayama *et al.*, 2006), uno más corto y otro más largo (*OsPPCK2-S* y *OsPPCK2-L* respectivamente). La expresión diferencial de este gen en respuesta a la nutrición por fosfato y nitrógeno sugiere que la iniciación alternativa es un mecanismo de regulación de la *PPCK2* con significación fisiológica (Fukayama *et al.*, 2006).

### Otros mecanismos de regulación de la *PPCK*

Aunque la síntesis/degradación de la PEPC-quinasa representa el mecanismo principal de regulación, existen otros factores que pueden regular la actividad de la enzima. En este sentido, la PEPC-quinasa está regulada por el pH, siendo su óptimo *in vitro* de 8 (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994). Además, la fosforilación de la PEPC en ensayos reconstituidos con PEPC-quinasa está regulada por metabolitos

(Echevarría *et al.*, 1994). La fosforilación es inhibida por L-Malato (Echevarría *et al.*, 1994). Esta inhibición por L-Malato es revertida en presencia de G6P (Echevarría *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003). La base de este mecanismo sería un cambio de conformación de la PEPC en presencia de estos metabolitos y no una acción directa de ellos sobre la actividad PEPC-quinasa (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994; Echevarría y Vidal, 2003). Esta regulación por metabolitos de la fosforilación de la PEPC también ocurre durante el desarrollo, maduración y germinación de semillas de cebada y de sorgo (Feria *et al.*, 2005; Osuna *et al.*, 1999).

Recientemente se ha aislado un inhibidor de la PEPC-quinasa de hojas de plantas  $C_4$  (en maíz) y CAM (en *K. fedtschenkoi*). Su naturaleza es proteica (100 kDa), y se une por interacción directa inhibiendo el nivel basal de PEPC-quinasa existente en condiciones bajo las cuales no se requiere un flujo rápido de carbono a través de la PEPC (Nimmo *et al.*, 2001). Por el momento no parece estar directamente implicado, como elemento esencial, en la regulación luz/oscuridad de la actividad PEPC-quinasa  $C_4$  o de la regulación circadiana de la PEPC-quinasa de plantas CAM.

Por otra parte, los trabajos de Saze *et al.* (2001) muestran que la PPCK de maíz se inactiva *in vitro* en condiciones semi-oxidativas, y se reactiva eficientemente por una reducción mediada por tioredoxina. Además, observan el mismo fenómeno con la PPCK de *F. trinervia* (Saze *et al.*, 2001). Sin embargo, no han obtenido evidencias de que el mecanismo sea operativo *in vivo* o que esté implicado en la regulación circadiana de la PPCK, ni en plantas  $C_4$  ni en CAM.

Otro mecanismo implicado en la regulación de la PPCK podría provenir de la interacción con su sustrato, la PEPC. En este sentido, se ha constatado que cuando se utiliza como sustrato de la fosforilación un péptido sintético de 20 aminoácidos que contiene el dominio de fosforilación de la PEPC, la eficiencia de la fosforilación por la PPCK es muy baja. Estos resultados sugirieron la existencia de un sitio secundario de interacción con la PPCK. Este segundo sitio de interacción es, al menos *in vitro*, el extremo C-terminal de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003). Resultados recientes obtenidos por nuestro grupo mostraron que un péptido sintético que contiene los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC, inhibe *in vitro* la fosforilación de la PEPC por la PPCK, aportando la primera evidencia de que la alta especificidad de la

PEPC-quinasa por la PEPC, podría provenir de la interacción con el dominio C-terminal hidrofóbico de su sustrato (Álvarez *et al.*, 2003).

### Regulación de la PPCK en condiciones de estrés

Las plantas  $C_4$  y CAM son conocidas por tener una eficiencia hídrica superior a la de las plantas  $C_3$  (Smith y Winter, 1996). Además, son plantas muy competitivas en ambientes salinos (Echevarría *et al.*, 1988; Hasegawa, 2000). La contribución de la PEPC a esta respuesta al estrés salino se demostró en algunas especies  $C_4$  como el sorgo (Amzallag *et al.*, 1990), y también en especies  $C_3$  (Popova *et al.*, 1995), con un aumento de la actividad PEPC. También se ha mostrado un aumento de la actividad PEPC en nódulos tratados con diferentes concentraciones de sal (Soussi *et al.*, 1998). En la planta halófila *Mesembryanthemum crystallinum* la salinidad induce la transcripción y la actividad de la PEPC y del metabolismo CAM. Sin embargo, curiosamente, el promotor de la PEPC de *Mesembryanthemum crystallinum* expresado en plantas transgénicas de tabaco no es inducible por sal (Cushman *et al.*, 1993).

En la actualidad se sabe que el estrés salino conlleva un incremento de PEPC y paralelamente un aumento de actividad nocturna de la PPCK  $Ca^{2+}$ -independiente, en plantas CAM (Chollet *et al.*, 1996). Estudios realizados en la planta *Clusia*, con patrones fotosintéticos entre  $C_3$  y CAM constitutivo, han podido demostrar que la expresión de la PEPC es el factor primario determinado por la capacidad genotípica del CAM y que la abundancia de transcritos de PPCK regulados durante el día y la noche (alto durante la noche) es más bien la consecuencia del funcionamiento del CAM y de la fluctuación diurna de metabolitos (Taybi *et al.*, 2004). Si bien se sabe que la expresión de la PEPC en la inducción del CAM por salinidad u otros factores de estrés es también producida por ABA (Taybi *et al.*, 2002), no existen datos sobre la participación de esta hormona en la expresión de la PPCK.

La inducción de la PEPC y de la PPCK en el metabolismo CAM está bien documentada (Taybi *et al.*, 2002; Nimmo, 2003); sin embargo, existen pocos trabajos sobre la contribución del mecanismo de fosforilación de la PEPC a la adaptación o tolerancia a la salinidad, y en general a otros estreses, en plantas  $C_4$ . Este concepto es tanto más importante cuanto que es

conocido que en la planta  $C_4$  la fosforilación de la PEPC responde del 85% de la eficacia fotosintética (Bakrim *et al.*, 1993; Nimmo, 2000).

Los primeros resultados publicados sobre el efecto de la salinidad en la PPCK y en la fosforilación de la PEPC en una planta  $C_4$  fueron obtenidos por nuestro grupo y derivan del hallazgo de un espectacular aumento de la actividad de la PPCK en extractos crudos de plantas de sorgo aclimatadas a concentraciones crecientes de NaCl (172 y 258 mM NaCl). Este aumento de PPCK repercute en un incremento de la fosforilación in vivo de la PEPC, sin embargo los niveles de PEPC no se ven alterados (Echevarría *et al.*, 2001). El efecto sobre la PPCK es independiente del estrés osmótico; se debe a la toxicidad iónica siendo también promovido por  $Li^+$  (García-Mauriño *et al.*, 2003), y no es promovido por la aplicación de ABA exógeno bien a cultivos hidropónicos o por pulverización foliar (Echevarría *et al.*, 2001). Por último, el tratamiento con NaCl aumenta la actividad PPCK de hojas de sorgo en oscuridad en un proceso que depende de síntesis proteica. Este es el primer contexto metabólico en el que se induce la síntesis de la PPCK en oscuridad, en una hoja de planta  $C_4$ . La consecuencia de este hecho es un considerable aumento de la concentración de malato en oscuridad además de un incremento de malato en luz respecto de las plantas controles. La ausencia de fijación nocturna de  $CO_2$  parece indicar que la planta  $C_4$  en condiciones de estrés severo, al igual que algunas  $C_3$ , podría manifestar un CAM-latente con un aumento de los niveles de malato tanto nocturnos como diurnos (García-Mauriño *et al.*, 2003). Además del estrés salino se han descrito resultados sobre un aumento de la PPCK en aire libre de  $CO_2$ , en plantas CAM (Nimmo, 2000) y en estrés oxidativo (Izui *et al.*, 2004).

En conjunto estos resultados indican que la participación de la PEPC en situaciones de desecación, salinidad, o  $CO_2$  limitante, se puede establecer por una regulación del nivel de fosforilación de la enzima destacando el papel de la PPCK como enzima implicada en mecanismos de tolerancia al estrés.

### Regulación de la degradación de la PEPC-quinasa

El protagonismo en los estudios de la PPCK ha estado centrado en la regulación de la síntesis de la enzima y de la cadena de transducción de señales que

conduce a la síntesis/activación tanto en plantas  $C_4$  como CAM. Este hecho está justificado porque la síntesis de la PPCK es el elemento principal de la regulación circadiana de la actividad PPCK en estas plantas. En este sentido se le ha prestado muy poca atención a la regulación de la degradación y a los mecanismos implicados. Los resultados obtenidos por el grupo de Izui (Agetsuma *et al.*, 2005), utilizando una PEPC-quinasa recombinante de *F. trinervia* expresada transitoriamente en protoplastos de células de mesófilo de maíz, sugieren que la PEPC-quinasa puede ser degradada vía ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, los experimentos realizados con anticuerpos anti ubiquitina en los que utiliza extractos crudos o PPCK purificada de hojas de maíz no le han permitido mostrar que la PPCK de la planta esté ubiquitinada, sugiriendo que pueda ser debido a una falta de afinidad del anticuerpo o a la poca abundancia de esta proteína. Resultados recientes obtenidos por nuestro grupo muestran que en hojas de sorgo la degradación de la PPCK está regulada por ABA en un proceso que podría estar mediado por el proteosoma. Tanto el ABA como el inhibidor MG132, infiltrados a hojas o a discos de hojas inhiben la degradación de la PPCK. Estas son la primeras evidencias mostradas en plantas de que la degradación de la PPCK podría regularse por un mecanismo en el que estaría implicado el ABA y el proteosoma (Monreal *et al.*, 2007a). La regulación de la degradación de la PPCK podría tomar relevancia en contextos específicos como plantas sometidas a estrés. En este sentido, hemos obtenido evidencias de que en plantas tratados con  $Li^+$  el aumento espectacular de PPCK que se mantiene a partir de 30 min de iluminación es independiente de la transcripción de la PPCK vía PLC, y se debe, en parte, a la inhibición de la degradación (Monreal *et al.*, 2007b).

### Otras vías alternativas de señalización para la síntesis/activación de la PPCK

Los trabajos realizados por nuestro grupo sobre la cadena de señalización que conduce a la síntesis/activación de la PPCK en condiciones de estrés salino o  $Li^+$  han aportado una nueva visión de esta señalización y han abierto nuevas alternativas de gran importancia. El hecho clave ha sido trabajar con discos de hojas en contraposición a los estudios clásicos de señalización realizados en protoplastos de hojas. En este sistema, la

fosforilación de la PEPC no se inhibe en presencia de TMB8 o verapamil (inhibidores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de los compartimentos endógenos como la vacuola) sino que necesita la presencia de EGTA en el medio de incubación de los discos de hojas. Este experimento ha puesto en evidencia por primera vez que la ruta de señalización de la PPCK puede utilizar tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno como el exógeno. Además, en discos de hojas y en hojas infiltradas, el inhibidor de la ruta de la PI-PLC, el U73123, no inhibe por completo la activación de la PPCK como ocurre en protoplastos (Coursol *et al.*, 2000), indicando que la activación de la PPCK puede ocurrir por vías alternativas a la descrita hasta la fecha en la que la señalización se produce por la vía de la PI-PLC. Estos resultados sugieren además que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del plasmalema, poco activos en los protoplastos, son funcionales en el sistema íntegro de las hojas con una importante repercusión en los recursos de utilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la versatilidad de la respuesta de activación de la PPCK. También hemos puesto en evidencia que el n-butanol (inhibidor de la ruta de la fosfolipasa D) inhibe la síntesis de la PPCK

sugiriendo que la ruta de la fosfolipasa D (PLD) podría representar una ruta alternativa o adicional de señalización. Otro mensajero de esta ruta como el ácido fosfatídico (PA) también parece intervenir; sin embargo serán necesarios más experimentos para consolidar estas alternativas. Una hipótesis que pudiera integrar estas posibilidades podría ser que la enzima de la cadena de transducción que es regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (inhibida por W7) estuviera también regulada por PA, lo que podría llevarnos a una quinasa del tipo proteína quinasa C (PKC). En plantas no existen PKC como tal pero sí CDPK que responden a estos criterios de regulación, las PKC-like (Hrabak *et al.*, 2003). Una enzima de estas características ha sido recientemente caracterizada en hojas de sorgo (Osuna *et al.*, 2004). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Vidal muestran que esta enzima está presente en las hojas de plantas  $\text{C}_4$  y que es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y por PA. La figura 2 ilustra un esquema hipotético de la organización de los diferentes elementos nuevos que podría intervenir en la señalización de la síntesis de la PPCK en las células del mesófilo iniciando en los puntos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ .

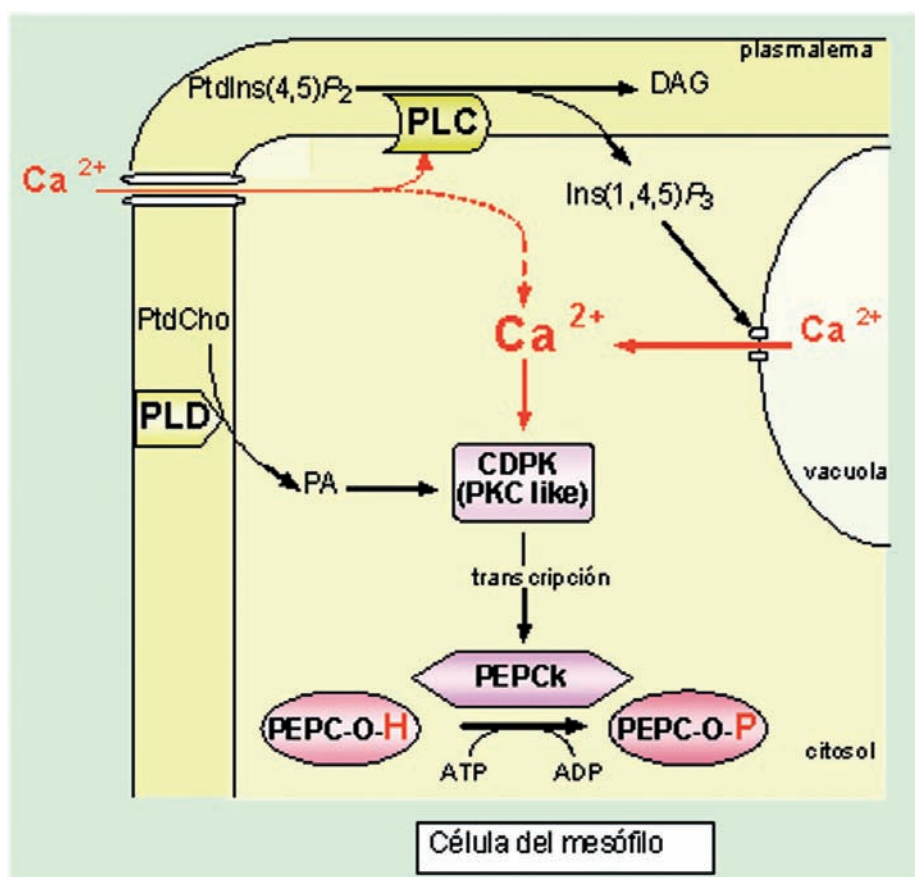


FIGURA 2: Posible papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización que controla la síntesis de la PPCK en las células del mesófilo. Posible implicación de la PLD y de una PKC-like. CDPK, quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente calmodulina independiente; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D;  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , inositol 1,4,5 trisfosfato; PA, ácido fosfatídico;  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , fosfatidylinositol - 4,5- bifosfato;  $\text{PtdCho}$ , fosfatidilcolina; PEPC-OH y PEPC-OP, PEPC en su forma desfosforilada y fosforilada respectivamente. PEPCk, fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa. (Esquema adaptado de Vidal *et al.*, 2007. Calcium and the control of  $\text{C}_4$  photosynthesis. *Med. Sci.* 23, 18-20).

## Referencias bibliográficas

- AGETSUMA, M.; FURUMOTO, T.; YANAGISAWA, S. e IZUI, K., 2005. «The ubiquitin-proteasome pathway is involved in rapid degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase for C<sub>4</sub> photosynthesis». *Plant Cell Physiol.* 46, 389-398.
- ÁLVAREZ, R.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; FERIA, A.B.; VIDAL, J. y ECHEVARRÍA, C., 2003. «A conserved 19 amino acid synthetic peptide from the carboxy-terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the in vitro phosphorylation of the enzyme by the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase». *Plant Physiol.* 132, 1097-1106.
- AMZALLAG, G.N.; LERNER, H.R. y POLJAKOFF-MAYBER, A., 1990. «Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity». *Journal Exp. Botany* 41 (233), 1529-1534.
- BAKRIM, N.; PRIOL, J.L.; DELEENS, E.; ROCHER, J.P.; ARRIODUPONT, M.; PIERRE, J.N.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1993. «Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEPC, a cardinal event influencing the photosynthesis rate in *Sorghum* and maize». *Plant Physiol.* 101, 891-897.
- BAKRIM, N.; BRULFERT, J.; VIDAL, J. y CHOLLET, R., 2001. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is controlled by a similar signaling cascade in CAM and C<sub>4</sub> plants». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 1158-1162.
- BANDURSKI, R.S. y GREINER, C.M., 1953. «The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide». *J. Biol. Chem.* 204, 781-786.
- BLÄSING, O.E.; WESTHOFF, P. y SVENSSON, P., 2000. «Evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Flaveria*, a conserved serine residue in the carboxy-terminal part of the enzyme is a major determinant for C<sub>4</sub>-specific characteristics». *J. Biol. Chem.* 275, 27917-27923.
- CHOLLET, R.; VIDAL, J. y O'LEARY, M., 1996. «Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous highly regulated enzyme in plants». *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 273-298.
- CRÉTIN, C.; SANTI, S.; KERYER, E.; LEPINIEC, L.; TAGU, D.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1991. «The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in *Sorghum*: promoter structure, amino acid sequences and expression of genes». *Gene*, 99, 87-94.
- CUSHMAN, J.C.; MEINERS, M.S. y BOHNERT, H.J., 1993. «Expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* is not salt-inducible in mature transgenic tobacco». *Plant. Mol. Biol.* 21, 561-566.
- CUSHMAN, J.C. y BOHNERT, H.J., 1999. «Crassulacean acid metabolism: molecular genetics». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 305-332.
- COURSOL, S.; GIGLIOLI-GUIVARCH, N.; VIDAL, J. y PIERRE, J.N., 2000. «An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in illuminated and NH<sub>4</sub>Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*». *Plant J.* 23, 497-506.
- DONG, L.Y.; MASUDA, T.; KAWAMURA, T.; HATA, S. y IZUI, K., 1998. «Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C<sub>4</sub>-form enzyme». *Plant Cell Physiol.* 39, 865-873.
- ECHEVARRÍA, C.; VAQUERO, I. y GIL, F., 1988. «Aportación al conocimiento del metabolismo fotosintético utilizado por cormofitas del Parque Natural de las Marismas del Odiel». *Lagascalia*, 15 (extra), 509-526.
- ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J.; JIAO, J. y CHOLLET, R., 1990. «Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves». *FEBS Lett.* 275, 25-28.
- ECHEVARRÍA, C.; PACQUIT, V.; BAKRIM, N.; OSUNA, L.; DELGADO, B.; ARRIO-DUPONT, M. y VIDAL, J., 1994. «The effect of pH on the covalent and metabolic control of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf». *Arch. Biochem. Biophys.* 315(2), 425-430.
- ECHEVARRÍA, C.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; ÁLVAREZ, R.; SOLER, A. y VIDAL, J., 2001. «Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in *Sorghum* plants». *Planta*. 214, 283-287.
- ECHEVARRÍA, C. y VIDAL, J., 2003. «The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase». *Plant Physiol. Biochem.* 41, 541-547.
- ECHEVARRÍA, C.; FERIA, A.B.; MONREAL, J.A.; JIMÉNEZ, E.T.; ÁLVAREZ, R. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2004. «Regulación transcripcional y posttraduccional de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK) por factores abióticos, estrés y hormonas». En *Metabolismo y modo de acción de fitohormonas*. Ediciones Universidad de Salamanca, 211-229. Salamanca (España).
- FERIA, A.B.; ÁLVAREZ, R.; COCHEREAU, L.; VIDAL, J.; GARCÍA-MAURIÑO, S. y ECHEVARRÍA, C., 2008. «Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and ABA during the development and germination of Barley seed». *Plant Physiology*, 148, 761-774.
- FONTAINE, V.; HARTWEL, G.; JENKINS, H.G. y NIMMO, H.G., 2002. «Arabidopsis thaliana contains two phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes with different expression pattern». *Plant Cell Environ.* 25, 115-122.
- FUKAYAMA, H.; TAMAY, T.; TANIGUCHI, Y.; SULLIVAN, S.; MIYAO, M. y NIMMO, H.G., 2006. «Characterization and functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in rice». *Plant J.* 47, 258-268.
- GARCÍA-MAURIÑO, S.; MONREAL, J.A.; ÁLVAREZ, R.; VIDAL, J. y ECHEVARRÍA, C., 2003. «Characterization of a salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation». *Planta*. 216, 648-655.
- GONZÁLEZ, M.C.; OSUNA, L.; ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J. y CEJUDO, F.J., 1997. «Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains». *Plant Physiol.* 116, 1249-1258.
- GOUSSET-DUPONT, A.; LEBOUTEILLER, B.; MONREAL, J.A.; ECHEVARRÍA, C.; PIERRE, J.N.; HODGES, M. y VIDAL, J., 2005. «Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*». *Plant Sci.* 169, 096-1101.
- GIGLIOLI-GUIVARCH, N.; PIERRE, J.N.; BROWN, S.; CHOLLET, R.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1996. «The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*». *The Plant Cell*, 8, 573-586.
- HARTWELL, J.; GILL, A.; NIMMO, G.A.; WILKINS, M.B.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 1999. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression». *Plant J.* 20, 333-342.

- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K. y BOHNERT, H., 2000. «Plant cellular and Molecular Responses to High Salinity». *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 463-99.
- HATCH, M.D., y SLACK, C.R., 1970. «Photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation pathway». *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 141-162.
- HRABAK, E.M.; CHAN, C.W.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.E.; CHOI, J.H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H.G.; SUSSMAN, M.R.; THOMAS, M.; WALKER-SIMMONS, K.; ZHU, J.K. y HARMON, A.C., 2003. «The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases». *Plant Physiol.*, 132, 666-680.
- IZUI, K.; MATSUMURA, H.; FURUMOTO, T. y KAI, Y., 2004. «Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new Era of Structural Biology». *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 55, 69-84.
- JIAO, J.A.; ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J. y CHOLLET, R., 1991. «Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C<sub>4</sub> plants». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 2712-2715.
- LI, B.; ZHANG, X.Q. y CHOLLET, R., 1996. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize». *Plant Physiol.*, 111, 497-505.
- LÜTTGE, U., 2004. «Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM)». *Annals of Botany* 93, 629-652.
- MARSH, J.T.; SULLIVAN, S.; HARTWELL, J. y NIMMO, H.G., 2003. «Structure and expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in solanaceae. A novel gene exhibits alternative splicing». *Plant Physiol.*, 133, 2021-2028.
- MATSUMURA, H.; XIE, Y.; SHIRAKATA, S.; INOUE, T.; YOSHINAGA, T.; UENO, Y.; IZUI, K. y KAY, Y., 2002. «Crystal structures of C<sub>4</sub> form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylase». *Structure*, 10, 1721-1730.
- MONREAL, J.A.; FERIA, A.B.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2007a. «ABA modulates the degradation of PEPC-kinase in sorghum leaves». *FEBS letter*, (en prensa).
- MONREAL, J.A.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2007b. «Effect of Li on phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf disks and leaves of *Sorghum vulgare*». *Planta*, DOI 10.1007/s00425-006-0391-0.
- NIMMO, H.G., 2000. «The regulation of PEPC in CAM plants». *Trends in Plants Sci.*, 5, 75-80.
- 2003. «Control of phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants». *Arch. Biochem. Biophys.*, 414, 189-196.
- OSUNA, L.; GONZÁLEZ, M.C.; CEJUDO, J.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C., 1996. «In vivo and in vitro phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination». *Plant Physiol.* 111, 551-558.
- OSUNA, L.; PIERRE, J.N.; GONZÁLEZ, M.C.; ÁLVAREZ, R.; CEJUDO, F.J. y ECHEVARRÍA, C., 1999. «Evidence for a slow-turnover form of the, calcio-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone endosperme of germinating barley seeds». *Plant Physiol.*, 119, 511-520.
- OSUNA, L.; COURSO, S.; PIERRE, J.N. y VIDAL, J., 2004. «A Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase with characteristics of protein kinase C in leaves and mesophyll cell protoplasts from *Digitaria sanguinalis*: possible involvement in the C<sub>4</sub>-phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 428-433.
- PACQUIT, V.; SANTI, S.; CRETIN, C.; BUI, V.L.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1993. «Production and properties of recombinant C<sub>3</sub>-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: in vitro phosphorylation by leaf and root PyrPC protein serine kinases». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197, 1415-1423.
- PIERRE, J.N.; PRIETO, J.L.; GADAL, P. y VIDAL, J., 2004. «In situ c(4) phosphoenolpyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *digitaria sanguinalis* mesophyll cells». *Photosynthesis Res.*, 79(3), 349-55.
- POPOVA, L.P.; STOINOVA, Z.G. y MASLENKOVA, L.T., 1995. «Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress». *J. Plant Growth Regul.*, 14(4), 211-218.
- SÁNCHEZ, R. y CEJUDO, F.J., 2003. «Identification and analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice». *Plant Physiol.*, 132, 949-957.
- SAZE, H.; UENO, T.; HISABORI, H.; HAYASHI, H. y IZUI, K., 2001. «Thioredoxin-mediated reductive action of a protein kinase for the regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub>-form phosphoenolpyruvate carboxylase from maize». *Plant Cell Physiol.*, 42, 1295-1302.
- SHEEN, J., 1999. «C<sub>4</sub> gene expression». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.*, 50, 187-217.
- SHENTON, M.; FONTAINE, V.; HARTWELL, J.; MARSH, J.T.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 2006. «Distinct patterns of control and expression amongst members of PEP carboxylase kinase gene family in C<sub>4</sub> plants». *The Plant Journal*, 48, 45-53.
- SMITH, L.H.; LILLO, C.; NIMMO, H.G. y WILKINS, M.B., 1996. «Light regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in barley mesophyll protoplasts is modulated by protein synthesis and calcium, and not necessarily correlated with phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity». *Planta* 200, 174-180.
- SMITH, J.A.C. y WINTER, K., 1996. «Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism». En WINTER, K.; SMITH, J.A.C. *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Editado por Springer-Verlag, Berlin, 114, 427-436.
- SOUSSI, M.; OCAÑA, A. y LLUCH, C., 1998. «Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick pea (*Cicer arietinum* L.)». *J. Exp. Botany.*, 49(325), 1329-1337.
- SULLIVAN, S.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 2004. «Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean». *Plant Physiol.*, 135, 2078-2087.
- SULLIVAN, S.; SHENTON, M. y NIMMO, H.G., 2005. «Organ specificity in the circadian control of plant gene expression». *Biochem. Soc. Trans.* 33, 943-944.
- TAYBI, T. y CUSHMAN, J.C., 1999. «Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant». *Plant Physiol.*, 121, 545-556.
- 2002. «Abscisic acid signalling and protein synthesis requirements for phosphoenolpyruvate carboxylase transcript induction in the common ice plant». *J. Plant Physiol.*, 159, 1235-1243.
- TAYBI, T.; NIMMO, H.G. y BORLAND, A.M., 2004. «Expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes. Implications for genotypic capacity and phenotypic plasticity in the expression of crassulacean acid metabolism». *Plant Physiol.*, 135, 587-598.
- TSUCHIDA, Y.; FURUMOTO, T.; IZUMIDA, A.; HATA, S. y IZUI, K.,

2001. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase involved in C<sub>4</sub> photosynthesis in *Flaveria trinervia*: cDNA cloning and characterization». *FEBS Lett.*, 507, 318-322.
- VIDAL, J. y CHOLLET, R., 1997. «Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase». *Trend Plant Sci.* 2, 230-237.
- XU, W.; ZHOU, Y. y CHOLLET, R., 2003. «Identification and expression of a soybean nodule-enhanced PEP-carboxylase kinase gene (NE-PpcK) that shows striking up-/down-regulation *in vivo*». *Plant J.* 34, 441-452.
- XU, W.; SATO, S.J.; CLEMENTE, T.E. y CHOLLET, R. 2007. «The PEP-carboxylase kinase gene family in *Glycine max* (*Gm-PpcK1-4*): an in-depth molecular analysis with nodulated, non-transgenic and transgenic plants». *Plant J.*, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.03006.x.



# Interaction of thioredoxins *h* with maize endosperm protein fractions

ABDERRAKIB ZAHID and ROLAND CAZALIS\*

## Resumen

Las biotecnologías tienen aún mucho que hacer por su parte en el esfuerzo emprendido para mejorar la calidad de los alimentos. Las tioredoxinas se conocen por ser pequeñas proteínas reductoras, ubicuas, pudiendo modular la calidad reológica del gluten y reducir la alergenicidad de los productos que derivan de harina de cereales. Este trabajo analiza la interacción de tres Trx *h* así como la de *E. coli* sobre las fracciones proteicas del endospermo de maíz. Los resultados confirman la capacidad de estas proteínas para reducir los puentes disulfuros intra y/o intermoleculares que liberan así agrupaciones tioles identificables por medio de un marcaje con mBBR. Además, la Trx *h1* que posee una cisteína suplementaria en su dominio N-terminal muestra una gran capacidad para formar redes proteicas de altos pesos moleculares. Así, hay una cierta correlación entre las propiedades de estas proteínas identificadas in vitro y las características de sus interacciones con proteínas dianas. En la medida en que este tipo de interacción puede teóricamente hacerse con cualquier tioredoxina, cloroplastidica, animal, de levadura, bacteriana o de cualquier origen, este trabajo abre perspectivas debido a las numerosas posibilidades de intervenciones sobre la materia prima in vivo o in planta para mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos.

## Summary

Biotechnologies have still much work to do on their side in the effort made to improve food quality. Trx are known to be small ubiquitous reductases, being able to modulate gluten rheological quality and to lower allergenicity of products deriving from cereals flour. This present report analyzes the interaction of three Trx *h* as well as *E. coli* Trx on maize endosperm protein fractions. The data confirm the capacity of these proteins to reduce intra or / and intermolecular disulphides bridges, thus releasing free thiol groups which are identifiable by mBBR labelling. Trx *h1* which has an additional cysteine in its N-terminal domain shows a great capacity to form high molecular weights protein network. There is thus a correlation between these proteins properties underlined in vitro and their interactions characteristics with target proteins. Because these interactions can theoretically be done with any Trx, from chloroplast, animal, yeast,

bacterial or whatever, this opens many possibilities to intervene on raw material in vivo or in planta to improve food quality and safety.

**Abbreviations:** PMSF, phenylmethylsulfonyl chloride; mBBR, monobromobimane; TCA, trichloroacetic acid; DTT, dithiothreitol.

## Introduction

Food insecurity and malnutrition continue to be the major developmental challenge in the beginning of the 21<sup>st</sup> century. Nearly 200 million children younger than five years are undernourished for protein, leading to a number of health problems, including stunted growth, weakened resistance to infection and impaired intellectual development. In addition, malnutrition in the form of obesity is also increasing in several developing and developed countries. Efforts to overcome poverty must take into account various factors as the food consumption habits, food nutritional status, cropping system practiced, public policies and countless other factors. In spite of the significant advances made in genetic enhancement of crop plants for nutritional value, science and technology have to play a great role in the long-term global strategy for the fight against malnutrition.

Since the impact of cereal in worldwide nutrition, increases in the productivity of cereal grain crops have helped many developing countries achieve self-sufficiency in meeting the energy requirements. Maize (*Zea mays* L) (*C<sub>4</sub>* plant), is world's one of the three most popular cereal crops for both livestock feed and human nutrition. With its high content of carbohydrates, fats, proteins, some of the important vitamins and minerals, maize is the main food of the lower-socio-economic populations and in some regions it represents more than 80% of daily food consumption.

\* Université de Namur, Faculté des Sciences, SPS / URBV, 61 rue de Bruxelles, 5000, Namur, Belgique.

The maize kernel, like that of other cereal grains, includes pericarp (6%), endosperm (82%) and germ (12%) (Watson, 1987). The main structural component of the endosperm is starch, a complex carbohydrate that constitutes on an average 71% of the grain and is a source of concentrated energy. Most of the protein in a mature maize kernel is contained in the endosperm and the germ, but the endosperm protein is low in quantity as well as quality. In contrast the germ protein is sufficiently superior in quantity and quality. In normal maize, proportions of various endosperm storage protein fractions, on an average, are: albumins (3%), globulins (3%), zeins (60%) and glutelins (34%) (Salamini and Soave 1982). Zeins are characterized by a high content of glutamine, leucine and proline and are devoid of lysine and tryptophan. Since zeins are the main protein in normal genotypes, they considerably dilute the contribution of these essential amino acids which are in balanced content in the non-zeins proteins. The need to ameliorate the nutrition value of cereal grains and maize ones in particular was well known (Osborne and Mendel, 1914)

Serious efforts to improve the nutritional quality of maize endosperm protein began in the mid-60 and find a breaking point with the discovery of the biochemical effects of mutant alleles opaque-2 and floury-2 by the Purdue university researchers (Mertz *et al.*, 1964; Nelson *et al.*, 1965), which made grain protein in the endosperm nearly twice as nutritious as those found in normal maize. A continuing search for identifying new and better mutants has been underway during the past several decades. In spite of the discovery of new mutants such as opaque-7, opaque-6, floury-3, mucronate and defective endosperm, none offered any additional advantage over opaque-2 in maize breeding program.

Various strategies to improve quality protein maize were underway, but all them require long-term efforts to achieve lysine levels matching the specific mutants which give a big boost in lysine content. One of the approaches exploits double mutant combination; other is based on the use of two genetic systems involving opaque-2 gene and the genetic modifiers of the opaque-2 locus (Vassal, 2000; Prasanna *et al.*, 2001), and has been quite successful.

Genetic modification involving artificial altering of the genetic material of a species was one the alternative strategies developed in the 80. Crops have

been engineered to confer various benefits, such as increased yield and pest and weed resistance, resulting in reduced reliance on pesticides and herbicides, enhanced taste, drought resistance and aesthetic appeal, improved nutritive value, and longer shelf life (Falk *et al.*, 2002). In this area, different transgenic cereals with elevated thioredoxin *h* (Trx *h*) levels in seeds were obtained showing value-added traits (Cho *et al.*, 2007). Among these transgenic plants, wheat seed products appear less allergenic and more digestible whereas in barley seed, the appearance of alpha-amylase is accelerated and its abundance and activity are increased. In the same way, an advance of germination rate is observed with barley seeds (Cho *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2002).

Plant Trx *h* is involved in a wide variety of biological functions and the presence of its multiple forms has also been reported in plant seeds (Bestermann *et al.*, 1983). Trx *h* belongs to the redoxins family of small (12-14 kD) thermostable proteins with catalytically active disulfide groups. This class of proteins has been found in virtually all organisms, and has been implicated in myriad biochemical pathways (Buchanan *et al.*, 1994). The active site of Trx has two redox-active cysteine residues in a highly conserved amino acid sequence; when oxidized, these cysteines form a disulfide bridge (-S-S-) that can be reduced to the sulfhydryl (-SH) level through a variety of specific reactions. In physiological systems, this reduction may be accomplished by reduced ferredoxin, NADPH, or other associated thioredoxin-reducing agents.

Because of the quality of the reduced form, the addition of Trx promotes the formation of a protein network that produces flour with enhanced baking quality. Furthermore, Kobrehel *et al.*, (1994) have shown that the addition of Trx to flour of non-glutenous cereal such as rice, maize, and sorghum promotes the formation of a dough-like product.

Although Trx *h* have a homogeneous conformation, the particular microstructures of each protein are able to modulate determining effects in protein-protein interactions. It is therefore possible to modulate either dough rheological qualities or to obtain more targeted effects within the framework of an overexpression of a specific Trx in the grain. In this present report, we analyze the behaviour of different Trx against protein fractions from maize endosperm.

## Materials and methods

### Protein extraction

Seed wheat Trx $h$  were obtained as previously described (Cazalis *et al.*, 2006). *E. coli* Trx was purchased from Promega. Maize (*Zea mays* L.) seeds from inbred line, FG89, were ground in a M20 mill (IKA-WERKE) to pass 0.5 mm sieve. An Osborne fractionation was performed on 200 mg meal. Each extraction step was carried out with 1 mL of solvent by mixing vigorously and placing the microfuge tubes on a rotator for 2h. Between each fraction, the remaining meal was washed with water and the supernatant disregarded. The F1 fraction was extracted with 50 mM Tris, pH 7.9, and 1mM PMSF (Sigma) buffer. F2 fraction was extracted with 70% (v/v) ethanol. Centrifugations were all performed at 12 000 *g* for 5 min in a microcentrifuge and samples then stored at -20°C. Fraction F2 was concentrated at 4 °C on Ultracel 5K centrifugal filter unit (Millipore) according manufacturer instructions. Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976), with Bio-Rad reagent and BSA as a standard.

### Protein interaction

Protein fractions were stepwise reduced with DTT (Lindsay and Skerret, 1998). For the maize seed endosperm protein interaction with Trx, 1mM Trx  $h$ , previously reduced by 2 mM DTT was added to 60 µg protein extract and incubated at 30 °C for 30 min. samples were then applied to the gels for electrophoresis in non-reducing condition. In vitro protein mBBr labelling was carried out according Khobrehel *et al* (1992) with some adaptations. Protein interaction was performed as previously described. 400 nmol of mBBr was then added and the reaction was continued for another 15 min. 40 µl of a buffer (Tris 0.5M; pH 6.8; 4% SDS; 5 mM 2-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.005% bromophenol blue) was added to stop the reaction and derivatize excess mBBr, and the reaction continued for another 30 min at room temperature. Samples were then directly applied to gel. Following electrophoresis, gels were placed in 12% (w/v) TCA and soaked for 1 hr. Gels were then transferred to a solution of 40% methanol and 10% acid acetic overnight to remove excess mBBr. Fluorescence was visual-

ized under UV light (365 nm). Gels were then stained with coomassie brilliant blue R-250 in 40% methanol/10% acetic acid for 2 h and destained overnight in the previous buffer without coomassie.

## Results and discussion

### Thioredoxins

The Trx  $h$  used are characterized by different molecular mass (fig.1 A) due principally to the extension of the N-terminal domain of the protein. Trx  $h1$ , in addition to exhibit a low molecular weight, is characterized by a supplementary cysteine residue (Cys 11) in this domain upstream of the very typical active site WGGPC (Fig.1 B). The presence of this additional cysteine residue was reported in Trx  $h$  from monocots as well as from dicots (Ishiwatari *et al.*, 1995; Gelhaye *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2003). About Trx  $h1$ , it was shown that Cys-11 residue was more implied in dimer formation events than in reductase activity (Cazalis *et al.*, 2006). Trx  $h1$  is also characterized by having a phenylalanine residue (Phe17) at the N-terminus instead of the typical tryptophan residue which was usually seen as a Trx  $h$  protein signature (Stein *et al.*, 1995). Trx  $h2$  has a standard profile. Trx  $h3$  on the other hand, is characterized by its hydrophobic N-terminal domain and especially by the fact to appear exclusively in monomeric form, even in absence of a reducing agent such as DTT (Cazalis *et al.*, 2006).

### Protein fractions reduction

The stepwise reduction of protein fraction F1, made up albumins and globulins, is characterized by the variation in the molecular masses with the increase in the DTT concentration range. We observe the appearance of bands within molecular masses lower than 50 kD, which is concomitant with the disappearance of the higher molecular weight (fig.2 A).

The fraction F2 is mainly represented by zeins groups, the most relevant prolamins in the maize storage proteins. An ( $\alpha$ )-zein represents the most important member of this complex group, characterized by molecular masses of 19kD and 22 kD, which are alcohol-soluble.

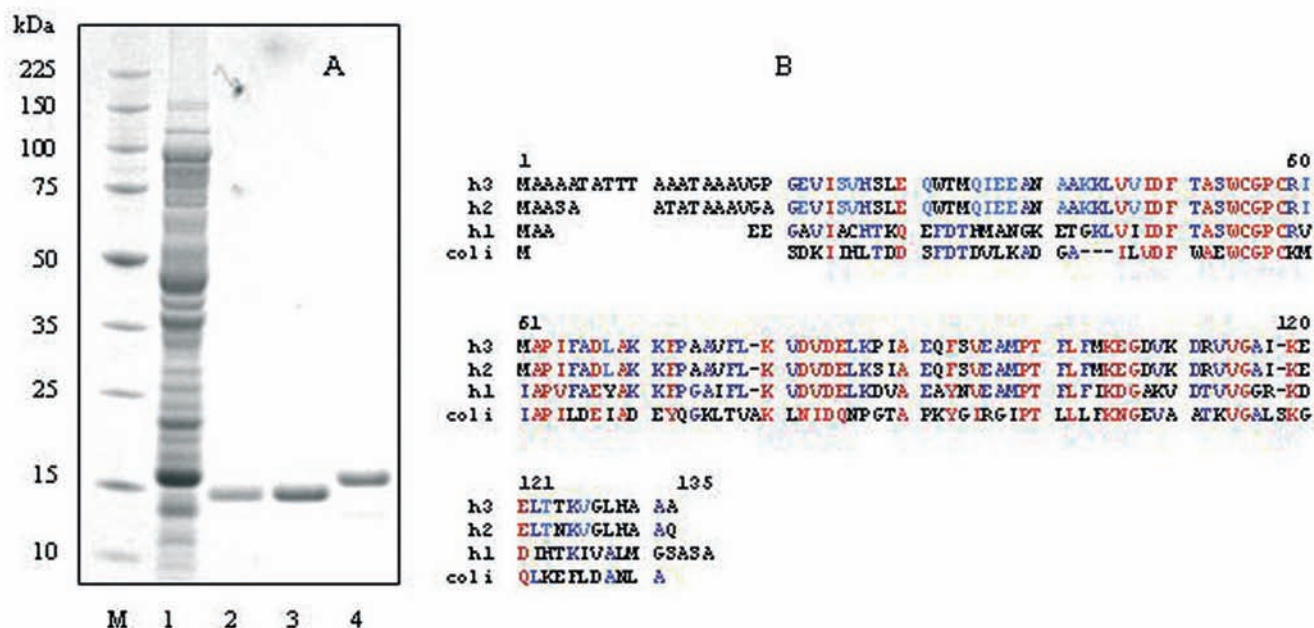


FIGURE 1. Overexpression and alignment of thioredoxins. (A) Gradient SDS-PAGE (4-12%) gels were loaded with the soluble fraction of *E. coli* BL21(DE3) transformed with the corresponding pET-Trx *h* construct and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. His-tagged protein was purified by Ni-chelate affinity chromatography. Lane1: Trx *h3* crude cell lysates; lane 2 to 4 eluates of the purified proteins of Trx<sub>h1</sub>, Trx<sub>h2</sub>, and Trx<sub>h3</sub>, respectively. Molecular markers (M) were loaded and their molecular mass in kDa is indicated on the left. (B) Alignment of wheat and *E. coli* thioredoxins. The accession numbers are as follows: Trx<sub>h1</sub>, AY072771; Trx<sub>h2</sub>, AF286593; Trx<sub>h3</sub>, AF420472; *E. coli*, NP418228.

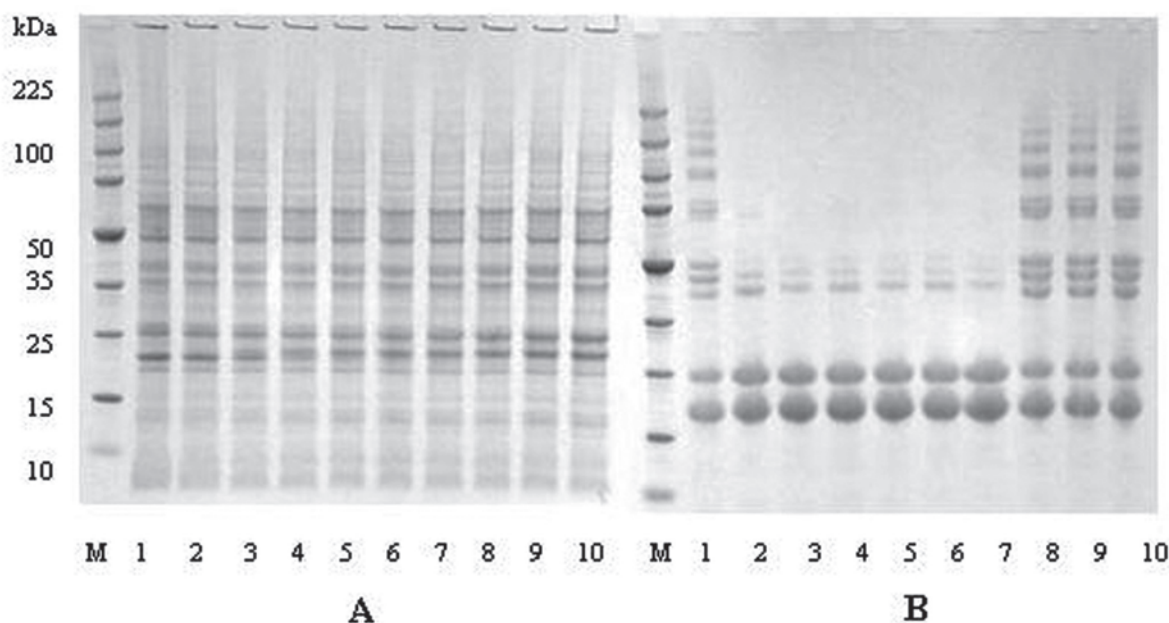


FIGURE 2. Protein fractions stepwise reduction. (A) Gradient SDS-PAGE (4-12%) analysis of protein samples from different stepwise reduction of soluble fraction F1 and (B) alcohol-soluble fraction F2. The DTT concentration range used was 0; 0.5; 2; 3; 4; 5; 10; 20 and 50 mM from lane 1 to 10 respectively. Molecular markers (M) were loaded and their molecular mass in kDa is indicated on the left.

Zeins of b (beta) and d (delta)-type, with a molecular mass of 14 kD and 10 kD respectively, are extracted in the presence of a reducing agent in alcohol-

ic solution. A reducing agent is also required for extracting g (gamma)-zein, with molecular masses of 16 and 27 kD.

The reduction of F2 fraction confirms available sulfhydryl groups linking polymeric proteins. This is able to highlight oligomerization events. Indeed, as the reducing agent concentration increases, we observe initially, an increase in the  $\alpha$ -( $\alpha$ )-zein fraction. At 10 mM of DTT, the concentration is enough to break particular molecular sulfur-sulfur bonds and a stochastic cross-link occurs among monomers giving place to high molecular weight polymers formation (Fig.2 B). This phenomenon simulates what could occur in dough by addition of reducing agent during kneading.

### Thioredoxin– proteins interactions

Bromobimanes in solution react with small thiols and with reactive protein thiol groups to form the corresponding S-labelled products which are stable and suitable for qualitative and quantitative determination (Crawford *et al.*, 1989). In this aim, maize endosperm proteins were extracted from full mature grain, labelled with mBBr and then subjected to SDS-PAGE. Qualitative analysis of sulfhydryl status shows either in F1 or in F2 that, in spite of the late storage mechanism during which, most proteins are oxidized, a significant number of SH groups remain free (Fig.3 A2; B2), as it was observed with wheat endosperm proteins (Rhazi *et al.*, 2003).

Trx interaction with the protein fractions underlines the two phenomena above mentioned, disulfide bridge reduction and network formation. With fraction F1, we observe that the greatest reducing capacity deals with *E. coli* Trx for which free thiol residues appear within the high molecular weights (Fig.3, A1). The electrophoretic pattern generate by others Trx *h* shows the appearance of a banding, which underline a marked tendency to network formation with F1 proteins fraction (Fig. 3, A2), as shown with mBBr fluorescence and Coomassie staining.

With fraction F2, one can underline the reducing action of Trx *h2* by the appearance of the free sulfhydryl residues, especially between 50 and 75 kD, and characterized beyond by the fluorescent smear (Fig.3 B2), while this fluorescence of the fully reduced proteins sample appears for molecular masses higher than 75 kD. Trx *h2* reduction capacity allows reformation of protein polymers of high molecular weigh as it occurred with the same fraction reduced by high DTT concentration (Fig.3, B2). We note in a less extent the

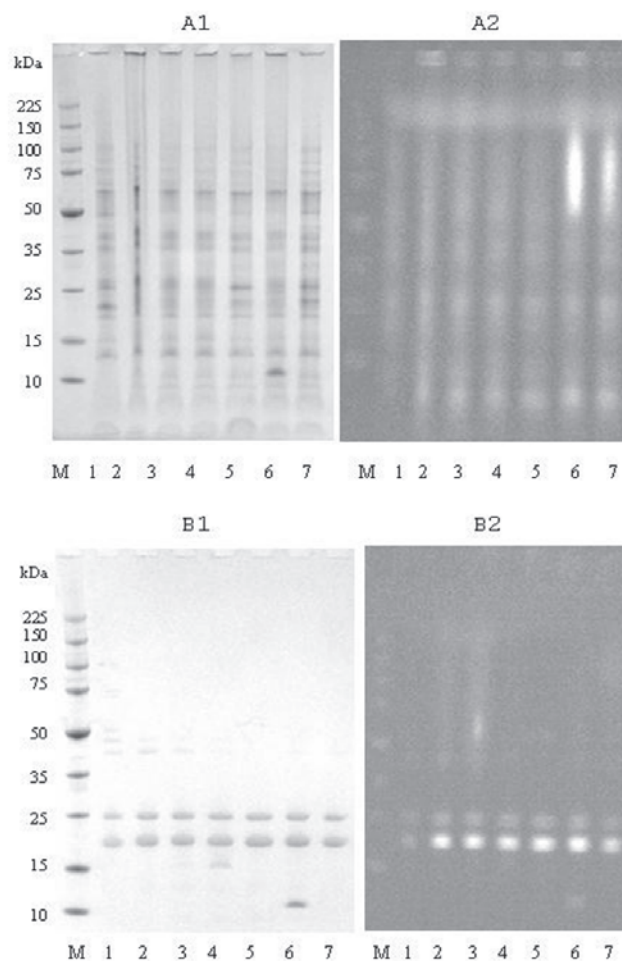


FIGURE 3. Thioredoxin-linked reduction of endosperm protein fractions. (A) Soluble protein fraction F1 and (B) alcohol-soluble protein fraction F2. Following incubation with the indicated Trx, the protein fractions were derivatized with mBBr, and fluorescence was visualized after SDS-PAGE (4-12%) (A2, B2). Gels were then stained with Coomassie R250 (A1, B1). Lane 1: protein alone; lane 2: DTT reduced protein; lanes 3 to 6, interaction with Trx *h2*, *h1*, *h3* and *E. coli* respectively; lane 7: fully reduced protein.

reducing activity of *E. coli* Trx on fraction F2 proteins. Trx *h1* and Trx *h3* for their part, generate a banding similar to what it is found with stepwise reduction of the  $\alpha$ -zeins fraction with a DTT concentration ranging from 1 to 5mM (Fig.2, B).

It was shown, in addition to activate enzymes, to reduce intramolecular disulfide bonds of storage proteins of the starchy endosperm, leading them to proteolysis (Kobrehel *et al.*, 1992; Lozano *et al.* 1996; Besse *et al.*, 1997), Trx alters the structure of 'chloroform-methanol' like proteins of the albumin/globulin fraction of wheat endosperm so they become more soluble (Wong *et al.*, 2004). On the basis of our results, we shows that the Trx *h* used in these experiments, interact

differently according to the protein fractions. Furthermore, we confirm that the third cysteine residue of Trx *h1* confers cross-linking capacities. Analysis of pea Trx *h* isoforms expression exhibited divergent patterns and levels of accumulation, suggesting non redundant functions (Montrichard et al, 2003; Traverso et al, 2007). Our results contribute to the unravelling of the biological functions of these Trx *h* in seed and suggest that these functions are furthermore related to the protein microstructures differences. This kind of reaction can be made virtually with any Trx, including the chloroplast Trx *f* and *m*, yeast and animal. This Trx pool constitutes an incomparable tool in biotechnology because one can choose the precise factor needed or can build it from these data base resources.

## Concluding remarks

Trx have a great potential to improve food quality, for the developing countries as well as the developed ones where people is more and more sensitive to allergens and where hypoallergenic foods from cereals and legumes seeds are more than suitable. This potential is not only related to in vitro applications to modulate dough rheological characteristics for bread and bread-like made of wheat flour or non-glutenous flours such as maize, including from dicot such as pea. These proteins still have a great potential in transgenic plants generation, overexpressing specific Trx. Research programs in metabolisms regulation involving change in the redox state of thiol groups undertaken by many laboratories around the world, and especially on these redoxins (Buchanan and Balmer, 2005; Sahrawy, 2005) are in the point of reaching elegant applications in food and health fields.

## Literature cited

- BESSE, I.; WONG, J.H.; KOBREHEL, K. and BUCHANAN, B.B., 1997. «Thiocalcin: a thioredoxin-linked substrate specific protease dependent on calcium». *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3169-3175.
- BESTERMANN, A.; VOGT, K. and FOLLMANN, H., 1983. «Plant seeds contain several thioredoxins of regular size». *Eur. J. Biochem.* 131, 339-344.
- BRADFORD, M., 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BUCHANAN, B.B.; SCHÜRMANN, P.; DECOTTIGNIES, P. and LOZANO, R.M., 1994. «Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine». *Arch. Biochem. Biophys.* 314, 257-260.
- BUCHANAN, B.B. and YVES BALMER, Y., 2005. «Redox Regulation: A Broadening Horizon». *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 187-220.
- CAZALIS, R.; PULIDO, P.; AUSSÉNAC, T.; PÉREZ-RUIZ, J. M. and CEJUDO, F. J., 2006. «Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds». *J. Exp. Bot.* 57(10), 2165-2172.
- CHO, M.-J.; WONG, J.; MARX, C.; JIANG, W.; LEMAUX, P.G.; BUCHANAN, B. B., 1999. «Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in germinating barley seeds». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14641-14646.
- CHO, M.-J.; WONG, J. H.; LEMAUX, P.G. and Buchanan, B.B., 2007. «Transgenic plants with elevated thioredoxin levels». *US Patent 7179964*, FD (2002-07-12).
- CRAWFORD, N.A.; DROUX, M.; KOSOWER, N.S.; BUCHANAN, B.B., 1989. «Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin system in the reductive activation of target enzymes of isolated intact chloroplasts». *Archives Biochemistry Biophysics* 271, 223-239.
- FALK, M.C.; CHASSY, B.M.; HARLANDER, S.K.; HOBAN, T.J. 4<sup>th</sup>; MCGLOUGHLIN, M.N.; AKHLAGHI, A.R., 2002. «Food biotechnology: benefits and concerns». *J Nutr* 132, 1384-90.
- GELHAYE, E.; ROUHIER, N.; VLAMIS-GARDIKAS, A.; GIRARDET, J.-M.; SAUTIERE, P.-E.; SAYZET, M.; MARTIN, F.; JACQUOT, J.-P., 2003. «Identification and characterization of a third thioredoxin h in poplar». *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 629-635.
- ISHIWATARI, Y.; HONDA, C.; KAWASHIMA, I.; NAKAMURA, S.; HIRANO, H.; MORI, S.; FIJOWARA, T.; HAYASHI, H.; CHINO, M., 1995. «Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap». *Planta* 195, 456-463.
- KOBREHEL, K.; WONG, J.H.; BALOGH, A.; KISS, F.; YEE, B.C. and BUCHANAN, B.B., 1992. «Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h». *Plant Physiol.* 99, 919-924.
- KOBREHEL, K.; NIMBONA, C.; BUCHANAN, B.B.; BERGMANN, J.; WONG, H. and YEE, B. C. 1994. «Thioredoxin-linked reduction of wheat storage proteins. II. Technological consequences». In *Gluten Proteins* 1993. Association of Cereal Research, Detmold, pp.381-292.
- LINDSAY, M.P. and SKERRIT, J.H., 1998. «Examination of the structure of glutenin macropolymer in wheat flour and doughs by stepwise reduction». *J. Agric. Food Chem.* 46, 3447-3457.
- LOZANO, R.M.; WONG, J.H.; YEE, B.C.; PETERS, A.; KOBREHEL, K. and BUCHANAN, B.B., 1996. «New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development». *Planta* 200, 100-106.
- MAEDA, K.; FINNIE, C.; ØSTERGAARD, O.; SVENSSON, B., 2003. «Identification, cloning and Characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from barley seed proteome». *European Journal of Biochemistry* 270, 2633-2643.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S. and NELSON, O.E., 1964. «Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm». *Science*, 145, 279.
- MONTRICHARD, F.; RENARD, M.; ALKHALFIOUI, F.; DUVAL, F.D.; MACHEREL, D., 2003. «Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea». *Plant Physiology* 132, 1707-1715.

- NELSON, O.E.; MERTZ, E.T. and BATES, L.S., 1965. «Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins». *Science*, 150, 1469.
- OSBORNE, T.B. and MENDEL, L.B., 1914. «Amino acids in nutrition and growth». *J. Biol. Chem.*, 17, 325.
- PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B. and SINGH, N.N., 2001. «Quality protein maize». *Current Science* 81(10), 1308-1319.
- RHAZI, L.; CAZALIS, R.; AUSSENAC, T., 2003. «Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation». *Journal of Cereal Science* 38, 3-13.
- SAHRAWY, M., 2005. «A tribute to Julio Lopez-Gorge (1935-2004): the music in science». *Photosynthesis Research* 83, 283-286.
- SALAMINI, F. and SOAVE, C., in *Maize for biological research* (Ed. Sheridan, W. F.), University of North Dakota Press, 1982, pp. 155-160.
- STEIN, M.; JACQUOT, J.P.; JEANNETTE, E.; DECOTTIGNIES, P.; HODGES, M.; LANCELIN, J.M.; MITTARD, V.; SCHMITTER, J.M.; MIGINIAC-MASLOW, M., 1995. «Thioredoxin: structure of the genes coding for the chloroplastic m and cytosolic h isoforms: expression in Escherichia coli of the recombinant proteins, purification and biochemical properties». *Plant Molecular Biology* 28, 487-503.
- TRAVERSO, J.A.; VIGNOLS, F.; CAZALIS, R.; PULIDO, A.; SAHRAWY, M.; CEJUDO, F.J.; MEYER, Y. and CHUECA, A., 2007. «PsTRXh1 and PsTRXh2 Are Both Pea h-Type Thioredoxins with Antagonistic Behavior in Redox Imbalances». *Plant Physiology*, 143, 300-311.
- VASSAL, S. K., 2000. «Quality Protein Maize Story», *Food Nutr. Bull* 21,445-450.
- WATSON, S. A., in *Corn: chemistry and technology* (eds Watson, S. A. and Ramstad, P. T.), Am. Assoc. Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1987, pp. 5-82
- WONG, J.H.; KIM, Y-B.; REN, P-H.; CAI, N.; CHO, M. J.; HEDDEN, P.; LEMAUX, P.G. and BUCHANAN, B.B., 2002. «Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone». *PNAS* 99, 16325-16330.
- WONG, J.H.; CAI, N.; CHARLENE, K.; TANAKA, C.K.; VENSEL, W.H.; HURKMANW, J. and BUCHANAN, B.B., 2004. «Thioredoxin Reduction Alters the Solubility of Proteins of Wheat Starchy Endosperm: An Early Event in Cereal Germination». *Plant Cell Physiol.* 45(4), 407-415.



# Identificación histológica y ultraestructural de plantas $C_4$ y CAM

ADELA OLMEDILLA ARNAL,  
JUAN DE DIOS ALCHÉ RAMÍREZ  
y MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ GARCÍA\*

## Resumen

Para averiguar el tipo de metabolismo fotosintético que presentan distintas plantas vasculares del Parque Natural del Cabo de Gata-Níjar (Almería) se realizó un estudio histológico y ultraestructural de su anatomía foliar. Se estudiaron veintiséis especies pertenecientes a 10 familias distintas, de ellas 12 resultaron ser  $C_4$ , 2 CAM y el resto  $C_3$ . Además de las especies que se ajustaban a los modelos anatómicos descritos para cada tipo de metabolismo fotosintético se encontraron variaciones sobre todo en la anatomía Kranz típica de las plantas  $C_4$ .

La mayoría de las especies encontradas pertenecía a la familia *Chenopodiaceae* y entre ellas se pudieron diferenciar tanto plantas  $C_3$  como  $C_4$ . Las especies de esta familia también se distinguieron por la gran variabilidad anatómica de sus hojas, muestra de su capacidad para adaptarse a diferentes ambientes incluidos los áridos.

## Summary

In order to determine the type of photosynthetic metabolism displayed by different vascular plants of the Parque Natural del Cabo de Gata-Níjar (Almería) a histological and ultrastructural study of their leaf anatomy has been performed. Twenty six vascular plant species from 10 different families were studied. Twelve of them turned out to be  $C_4$ , 2 CAM and the remaining resulted to be  $C_3$ . Variations on the model of leaf anatomy were found, especially in the Kranz typical anatomy for  $C_4$  plants.

The majority of species found belonged to the *Chenopodiaceae* family in which it was possible to differentiate  $C_3$  and  $C_4$  plants. The species of this family were also distinguished by their large variability in their leaf anatomy, which reflects their ability of adaptation to different environments, arid included.

## Introducción

Las plantas son organismos sésiles por lo que tienen que adaptarse a los distintos ecosistemas terres-

tres. En zonas áridas o semiáridas, como es el caso del Parque Natural del Cabo de Gata-Níjar caracterizado por sus altas temperaturas, sus largos y soleados días de verano y por la escasa lluvia en invierno, las plantas deben subsistir a una intensa irradiación solar que viene acompañada de altas temperaturas, escasa disponibilidad hídrica y altas concentraciones salinas en el suelo.

La fotosíntesis es uno de los procesos básicos de la vida de las plantas y como tal las etapas clave del mismo están altamente conservadas en todas las especies. Sin embargo, se han encontrado distintas variantes al mecanismo molecular de fijación y asimilación del  $CO_2$  que están estrechamente relacionadas con procesos de adaptación a entornos más o menos hostiles (Sage, 2004; Sayed, 2001). Estas variaciones se manifiestan en cambios en la anatomía foliar que, en algunas ocasiones, sólo se hacen patentes después de un estudio ultraestructural de los cloroplastos de estas especies.

La asimilación del  $CO_2$  atmosférico por las plantas se realiza mediante las reacciones del Ciclo de Calvin que es común a todos los organismos fotosintéticos. La mayoría de las plantas son  $C_3$ : el primer producto de su fotosíntesis es una molécula de tres átomos de carbono y sus hojas presentan un solo tipo de cloroplastos. Existen, además, otras variedades fotosintéticas propias de vegetales superiores denominadas plantas  $C_4$  y plantas CAM (Crassulacean acid metabolism). En ellas, previa a la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato catalizada por la enzima rubisco que produce ácido fosfoglicérico de tres átomos de carbono, se produce una primera carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico (PEP) que origina como producto estable primario un ácido dicarboxílico de cuatro átomos de carbono (málico o aspártico). Tanto en las plantas  $C_4$  como en las CAM, se consigue concentrar el  $CO_2$  en torno a la enzima rubisco llegando casi a su nivel de saturación y

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

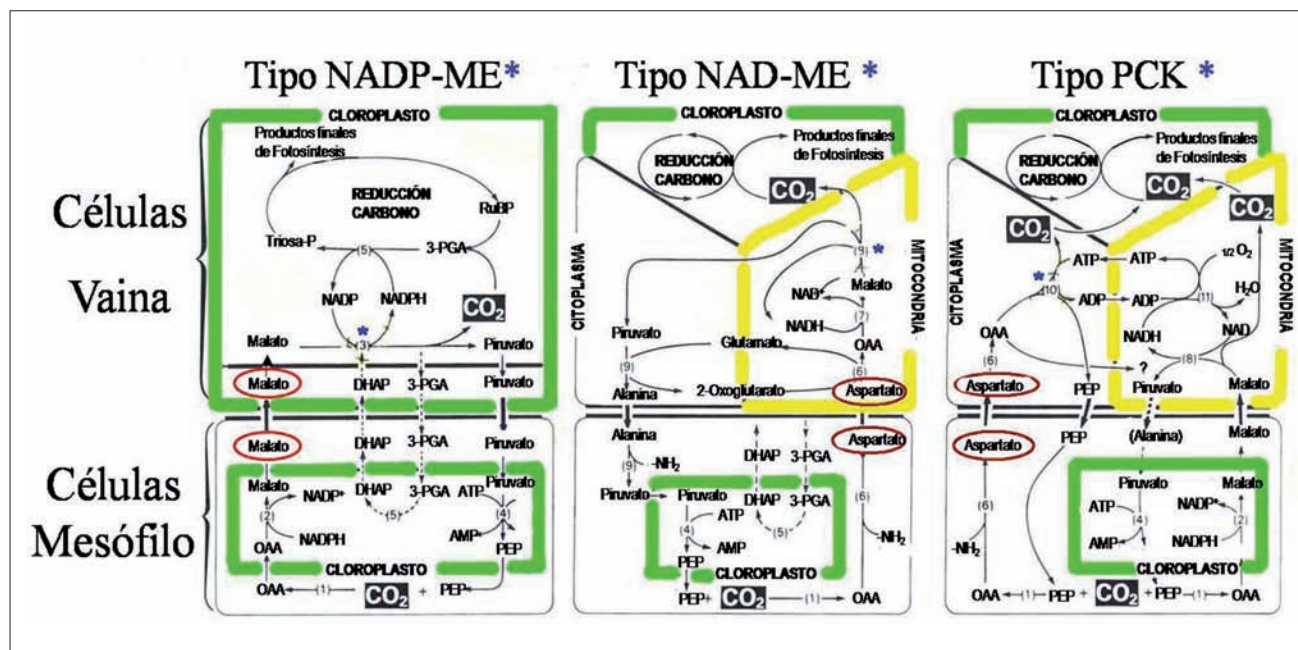
haciéndola así más eficaz en la segunda carboxilación al evitar al máximo la pérdida de  $\text{CO}_2$  en la fotorrespiración (Kanai y Edwards 1999; Sage, 2004). La mejora en la asimilación del  $\text{CO}_2$  atmosférico es posible gracias a que las carboxilaciones sucesivas se separan espacial o temporalmente. Esta mayor eficacia fotosintética les confiere una ventaja en su adaptación a ambientes con altas temperaturas, poca agua y alta salinidad lo que hace muy interesante su estudio.

En las plantas  $\text{C}_4$  la anatomía foliar generalmente se modifica de manera que se forman dos tipos celulares implicados en la fotosíntesis: las células de la vaina y las células del mesófilo que conforman la típica anatomía en corona o Kranz (Hatch, 1984; Sage, 2004). Las células de la vaina con una pared más gruesa, se distribuyen formando un anillo alrededor de los haces vasculares y las del mesófilo se encuentran bajo la epidermis rodeando a las de la vaina. Estas células presentan dos tipos de cloroplastos distintos de manera que en los del mesófilo se produce la primera carboxilación y en los de las células de la vaina se produce la reducción del carbono. En la mayoría de las especies  $\text{C}_4$  la carboxilación se realiza en el tejido que forman las células del mesófilo y la reducción en el que forman las células de la vaina, pero, dado que hay especies donde en estas funciones pueden intervenir además los cloro-

plastos de otras células de distinto origen; al primero, se le da el nombre genérico de tejido de asimilación fotosintética del carbono o PCA (photosynthetic carbon assimilation) y, al formado por las células donde se encuentra la rubisco y otras enzimas del ciclo de Calvin en las que se realiza la reducción, se le da el nombre de tejido de la reducción fotosintética del carbono o PCR (photosynthetic carbon reduction).

Existen otras modificaciones en la anatomía de las  $\text{C}_4$  ya que no todas presentan la anatomía Kranz o en corona clásica (Lawlor, 2001; Sage, 2004). Además, dependiendo de la enzima que utilizan en la descarboxilación de las moléculas de 4 átomos de carbono se han descrito tres subtipos diferentes: 1) málico descarboxilasa dependiente de NADP, 2) de NAD o 3) PEP carboxiquinasa. Estos subtipos implican diferencias morfológicas tales como la distribución de los cloroplastos en las células de la vaina con respecto al haz vascular. Así, los cloroplastos de las células de la vaina pueden presentar la llamada distribución centrípeta cuando los cloroplastos se polarizan hacia el haz vascular, o la centrífuga cuando los cloroplastos se distribuyen por toda la célula de la vaina (ver esquema modificado de Hatch, 1987).

Se han encontrado plantas  $\text{C}_4$  tanto en mono como en dicotiledóneas (Hatch, 1987; Sage, 2004) y



Esquema de los tres tipos de plantas  $\text{C}_4$  según la enzima que utilizan en la descarboxilación (modificado de Hatch, 1987). El asterisco azul muestra la etapa en la que actúa la enzima que determina el tipo de planta  $\text{C}_4$ . Dentro del círculo rojo se hace patente si son productoras de malato o aspartato. En verde se engloban las reacciones que se llevan a cabo en el cloroplasto y en amarillo en la mitocondria.

hay plantas con características morfológicas y funcionales tanto de las  $C_3$  como de las  $C_4$  por lo que han sido clasificadas como plantas intermedias  $C_3$ - $C_4$  (Rawsthorne, 1992; Hibberd and Quick, 2002).

En el caso de las plantas CAM, la primera carboxilación para fijar  $\text{CO}_2$  se realiza durante la noche cuando la pérdida de agua es más pequeña; de esta forma acumulan ácidos orgánicos, principalmente málico, en la vacuola. Esta acumulación es la que produce el sabor ácido de algunas Crasuláceas a primeras horas de la mañana y lo que les dio su nombre (metabolismo ácido de Crasuláceas o CAM, abreviatura de la denominación en inglés) (Teeri, 1982). Durante el día estos ácidos se transforman en azúcares a través del ciclo de Calvin. Para conseguir esta distribución temporal del metabolismo fotosintético las plantas CAM regulan la apertura de sus estomas al contrario que otras plantas: cerrándolos durante el día para evitar al máximo la pérdida de agua y abriéndolos durante la noche. Aunque prácticamente todas las plantas suculentas son plantas CAM, hay algunas suculentas, muchas de ellas halófilas, que no lo son y también hay plantas que no son suculentas pero sí presentan metabolismo fotosintético tipo CAM. Las plantas suculentas no poseen mesófilo en empalizada bien definido sino que el mesófilo esponjoso forma prácticamente toda la hoja, incluso la vaina que rodea los haces vasculares es mesofílica. Las células del mesófilo de estas plantas, además de cloroplastos, poseen grandes vacuolas donde se acumulan los ácidos por la noche (Nelson, 2005). Hay plantas CAM en distintas familias no sólo en *Crassulaceae*, *Cactaceae* y *Euphorbiaceae* sino también en *Cucurbitaceae*, *Geraniaceae*, *Labiatae*, *Lileaceae* y *Portulacaceae* (Sayed, 2001). Algunas plantas se pueden considerar como CAM facultativas pudiendo pasar de  $C_3$  a CAM dependiendo de las condiciones ambientales. En estas plantas la descarboxilación del malato durante el día puede ocurrir con cualquiera de las tres enzimas descritas para las  $C_4$  dependiendo de las especies.

Se han empleado distintas técnicas para determinar el metabolismo fotosintético de las plantas vasculares pero uno de los más usados ha sido el estudio de su anatomía foliar. En el marco del proyecto BAEZA financiado por la Fundación Ramón Areces se han realizado estudios histológicos y ultraestructurales de 26 especies encontradas en el Cabo de Gata en Almería para diferenciar los distintos tipos fotosintéticos. Estos

resultados junto con los de estudios botánicos y bioquímicos han permitido iniciar el catálogo de la flora de esta región.

## Materiales y métodos

Se recogieron plantas de 26 especies que crecían en el Cabo de Gata en Almería. Se tomaron fragmentos de hojas bien desarrolladas y sin señales de deterioro de unos pocos milímetros de lado, se fijaron durante 3 h a 4 °C en una mezcla de 4 % paraformaldehído y 2 % glutaraldehído en cacodilato 0,05 M, se postfijaron en  $\text{OsO}_4$  al 2 % en cacodilato 0,05 M y después de la deshidratación en series crecientes de etanol se incluyeron en Epon. Para el estudio al microscopio óptico se realizaron secciones transversales semifinas de 1 a 2 micras que se tiñeron con azul de toluidina mientras que las secciones ultrafinas fueron contrastadas con uranio y plomo antes de su observación al microscopio electrónico.

Para visualizar mejor las membranas de los cloroplastos y mitocondrias otros fragmentos de hoja se fijaron en paralelo en una solución acuosa de permanganato potásico al 2% en agua que fueron después deshidratados e incluidos en las mismas condiciones que las muestras fijadas en la mezcla de aldehídos detallada anteriormente. De estas muestras también se obtuvieron tanto cortes semifinos como ultrafinos que fueron estudiadas al microscopio óptico y electrónico respectivamente.

## Resultados

Las condiciones climáticas del Parque Natural del Cabo de Gata-Níjar en la provincia de Almería hacen posible el desarrollo de un gran número de especies xerofitas. A pesar del interés de estas plantas, no existen prácticamente catálogos de las especies de esta región.

En este estudio se han analizado las características histológicas y ultraestructurales de las hojas de 26 especies de plantas vasculares. Estas especies pertenecen a las 10 familias que se detallan en la Tabla 1. De acuerdo con los caracteres histológicos observados se han clasificado las plantas en tres grandes grupos: plantas  $C_3$  (12 especies), plantas  $C_4$  (12 especies) o CAM (2 especies).

TABLA 1

**Especies estudiadas.** Se detalla la familia a la que pertenecen y, de acuerdo con los resultados histológicos, se apunta el tipo de metabolismo fotosintético que tienen sus hojas:  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM.  $C_4$ -2 indica el subtipo 2 o NAD-ME

Especie	Familia	Tipo	Observaciones
<i>Amaranthus blitoides</i>	Amarantaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta.cloroplastos vaina con grana
<i>Arundo donax</i>	Poaceae	$C_3$	
<i>Atriplex glauca</i>	Chenopodiaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta.cloroplastos vaina con grana
<i>Atriplex halimus</i>	Chenopodiaceae	$C_4$	Distrib. centrifuga
<i>Atriplex semibaccata</i>	Chenopodiaceae	$C_4$	Distrib. centrifuga
<i>Beta maritima</i>	Chenopodiaceae	$C_3$	
<i>Calendula arvensis</i>	Compositae	$C_3$	
<i>Capparis spinosa</i>	Caparidaceae	$C_3$	
<i>Fagonia cretica</i>	Zygophyllaceae	$C_4$	Distrib. centrifuga
<i>Halimionae portulacoides</i>	Chenopodiaceae	$C_4$	Distrib. centrifuga
<i>Halogetum sativus</i>	Chenopodiaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta.cloroplastos vaina con grana
<i>Hordeum murinum</i>	Poaceae	$C_3$	
<i>Hyparrhenia hirta</i>	Poaceae	$C_4$	Distrib. centripeta.cloroplastos vaina con grana
<i>Launaea lanata</i>	Compositae	$C_3$	
<i>Lycium intricatum</i>	Solanaceae	$C_3$	
<i>Lygeum spartium</i>	Poaceae	$C_3$	
<i>Mesembryanthemum cristalinum</i>	Aizoaceae	CAM	
<i>Mesembryanthemum nodiflorum</i>	Aizoaceae	CAM	
<i>Oxalis pres-caprae</i>	Oxalidaceae	$C_3$	
<i>Periploca laevigata</i>	Asclepiadaceae	$C_3$	
<i>Salsola kali</i>	Chenopodiaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta
<i>Salsola oppositifolia</i>	Chenopodiaceae	$C_4$	Distrib. centrifuga
<i>Salsola vermiculata</i>	Chenopodiaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta
<i>Suaeda pruinosa</i>	Chenopodiaceae	$C_4$ -2	Distrib. centripeta
<i>Suaeda vera</i>	Chenopodiaceae	$C_3$	
<i>Zygophyllum fabago</i>	Zygophyllaceae	$C_3$	

### Plantas $C_3$

Hemos encontrado plantas  $C_3$  pertenecientes a distintas familias: *Poaceae* (3), *Chenopodiaceae* (2), *Compositae* (2), *Caparidaceae* (1), *Solanaceae* (1), *Oxalidaceae* (1), *Asclepiadaceae* (1) y *Zygophyllaceae* (1) (Tabla 1). Entre ellas observamos plantas con el mesófilo en empalizada y lagunar claramente distinguibles con un único tipo de cloroplastos adosados a la pared: *Calendula arvensis* (*Compositae*) y *Suaeda vera* (*Chenopodiaceae*) (figuras 1a, b, f y g). En el resto de plantas  $C_3$  no se distingue claramente el mesófilo en empalizada como en: *Arundo donax*, *Hordeum murinum* y *Lygeum spartium* (*Poaceae*); *Capparis spinosa* (*Caparidaceae*); *Beta*

*maritima* y *Zygophyllum fabago* (*Chenopodiaceae*); *Launaea lanata* (*Compositae*); *Lycium intricatum* (*Solanaceae*); *Oxalis pres-caprae* (*Oxalidaceae*) y *Periploca laevigata* (*Asclepiadaceae*) (figs. 1c, d, e). Pero en todas ellas se detecta un solo tipo de cloroplastos con grana bien desarrollados y que presentan gránulos de almidón, como puede verse con mayor detalle tras el estudio al microscopio electrónico (figs. 1b, f, g, h).

### Plantas $C_4$

También hemos encontrado especies  $C_4$  pertenecientes a distintas familias: *Chenopodiaceae* (9), *Ama-*

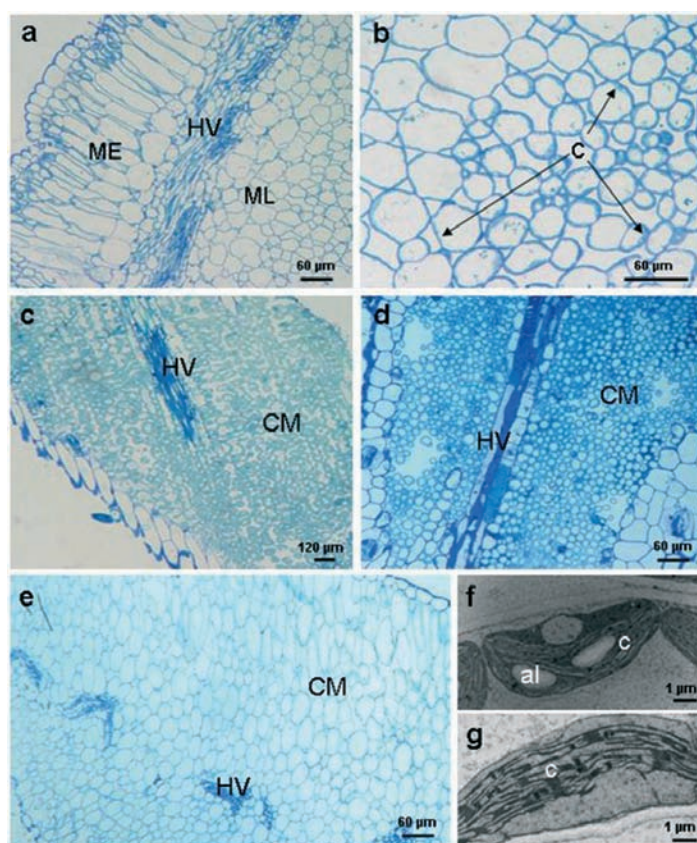


FIGURA 1. Plantas  $C_3$ . a-e: Secciones semifinas de hojas fijadas con aldehídos y teñidas con azul de toluidina obtenidas de: a, b) *Suaeda vera*, c) *Hordeum murinum* d) *Periploca laevigata*, e) *Zygophyllum fabago*. f,g: Cortes ultrafinos de hojas de *Calendula arvensis* fijadas con: f) aldehídos y g) permanganato potásico. Mesófilo en empalizada (ME) y lagunar (ML). Células del mesófilo (CM) y que acumulan agua (CA). Haces vasculares (HV). Cloroplastos (c).

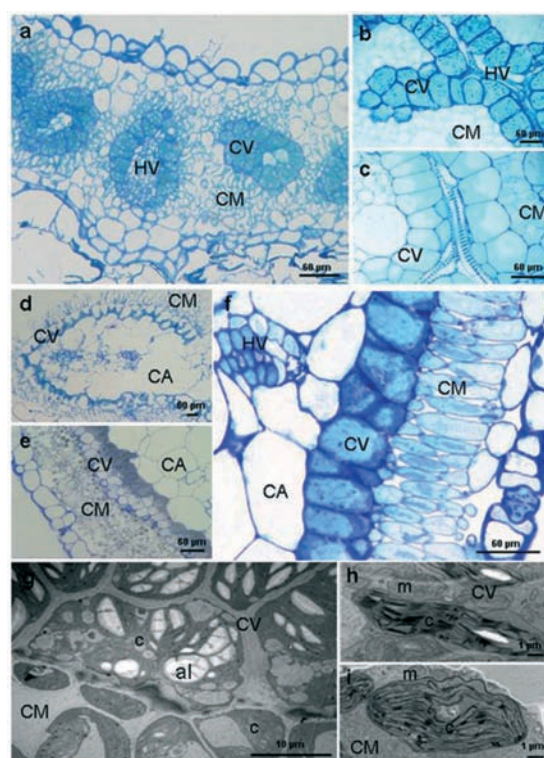


FIGURA 2. Plantas  $C_4$ . a, b, c, d, f: Secciones semifinas de hojas fijadas con aldehídos y teñidas con azul de toluidina obtenidas de: a) *Atriplex semibaccata*, b) *Halimionae portulacoides*, c) *Amaranthus blitoides*, d) *Suaeda pruinosa* y f) *Salsola oppositifolia*. e: Secciones semifinas de hojas de *Salsola kali* fijadas con permanganato. g, h, i: Cortes ultrafinos de hojas de *Atriplex semibaccata* fijadas con: g) aldehídos y h, i) permanganato potásico. Células del mesófilo (CM) y vaina (CV). Haces vasculares (HV). Cloroplastos (c) y mitocondrias (m).

rantaceae (1), Poaceae (1) y Zygophyllaceae (1) (fig. 2). Con la típica anatomía tipo Kranz (células del mesófilo inmediatamente bajo la epidermis y rodeando a las células de la vaina que forman un anillo alrededor de los haces vasculares) y cloroplastos con distribución centrífuga en las células de la vaina (cloroplastos distribuidos al azar en las células de la vaina, adyacentes a la pared de las células del mesófilo): *Atriplex halimus*, *Atriplex semibaccata*, *Fagonia cretica* y *Halimionae portulacoides* (figs. 2a, b). Con la típica anatomía tipo Kranz y cloroplastos con distribución centrípeta en las células de la vaina (cloroplastos orientados hacia el tejido vascular): *Amaranthus blitoides*, *Halogelum sativus*, e *Hyparrhenia hirta* (fig. 2 c). Suculentas con células que rodean a un tejido donde se acumula agua con una distribución centrípeta de sus cloroplastos: *Atriplex glauca*, *Salsola kali*, *Salsola vermiculata* y

*Suaeda pruinosa*. Todas con una sola capa de células rodeando a las células que almacenan agua excepto en el caso de *Salsola kali*, que presenta varias capas (figs. 2 d, e). También encontramos otra suculenta con mesófilo en empalizada y las células que rodean a las células que acumulan agua con una distribución centrífuga de sus cloroplastos *Salsola oppositifolia* (fig. 2 f). En todas ellas hemos encontrado dos tipos celulares con las células de la vaina con una pared más gruesa que la de las células del mesófilo y con cloroplastos distintos en ambos tipos de células. Estudiando los detalles ultraestructurales de dichos cloroplastos hemos podido observar también diferencias, por ejemplo, en el caso de los cloroplastos de *Atriplex semibaccata* observamos almidón principalmente en las células de la vaina y mayor cantidad de grana que en los del mesófilo (figs. 2 g, h, i).

## Plantas CAM

Se han encontrado dos especies CAM: *Mesembryantemum cristalinum* y *Mesembryantemum nodiflorum*, ambas pertenecientes a la familia *Aizoaceae* con un solo tipo de cloroplastos en el mesófilo. Dichos cloroplastos, ricos en almidón y plastoglóbulos, se sitúan adyacentes a la pared. Las células del mesófilo se encuentran en estrecho contacto unas con otras y contienen grandes vacuolas que dejan el citoplasma reducido a una fina banda con numerosas mitocondrias (fig. 3).

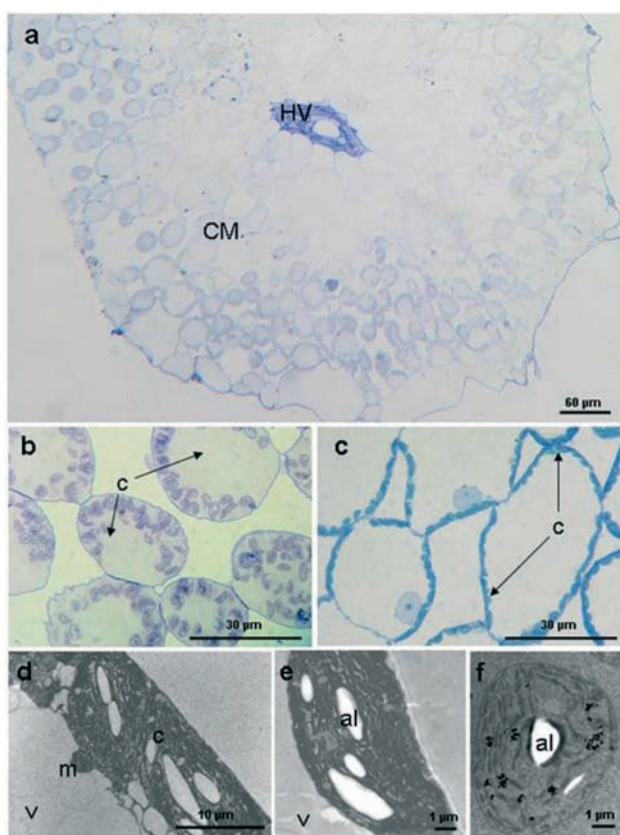


FIGURA 3. Plantas CAM. a,b,c: Secciones semifinas de hojas de *Mesembryantemum nodiflorum*: a, c) fijadas con permanganato y b) fijadas con mezclas de aldehídos. Células del mesófilo (CM). Hazes vasculares (HV). Cloroplastos (c).

## Discusión

De las especies estudiadas (26) en el Cabo de Gata (Tabla 1) la mayoría pertenece a la familia *Chenopodiaceae* (11), dentro de esta familia encontramos que son más numerosas las de tipo  $C_4$  (9) que las  $C_3$  (2). El resto de las especies pertenecen a distintas familias entre

las que predominan las de tipo  $C_3$  (10) frente a las  $C_4$  (3) y CAM (2). En resumen, podemos decir que, según nuestra selección de plantas, las plantas  $C_4$  y  $C_3$  tienen una representación similar en el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar (Almería) mientras que las especies CAM son minoritarias.

En las plantas  $C_3$ , además de la típica anatomía foliar en la que se distinguen claramente las células del mesófilo en empalizada situadas bajo la epidermis del haz y el mesófilo lagunar en el envés, hemos encontrado en nuestros estudios diversas variaciones. Algunas de ellas ya han sido previamente descritas (López y Devesa 1991, Jacobs 2001). Estas variaciones posiblemente se han producido en función de las condiciones ambientales donde se desarrollan.

Dentro de las  $C_4$  estudiadas, se han encontrado también modificaciones en la anatomía foliar. Ya desde los inicios de los estudios de las  $C_4$  se describieron variaciones en la anatomía foliar tipo Kranz (Downton, 1971). En la revisión de Sage (2004), se afirma que hasta ese momento se habían identificado hojas con más de 15 tipos de anatomía Kranz e incluso se recoge un nuevo tipo de fotosíntesis  $C_4$  que tiene lugar con un solo tipo de células fotosintéticas (Voznesenskaya et al. 2001, 2002). En estas últimas, la compartimentalización de las tareas fotosintéticas se realiza en distintas regiones de la célula con lo que se consigue fotosíntesis  $C_4$  sin la anatomía Kranz (Chuong et al. 2006).

En las especies que presentan anatomía Kranz con dos tipos celulares se modifica la pared externa de las células de la vaina o, en general, de las que forman el tejido donde se lleva a cabo la reducción del carbono (PCR, photosynthetic carbon reduction). Esta pared es más gruesa que la de las células del mesófilo de manera que se evita al máximo la pérdida de  $CO_2$ . En muchas herbáceas, dicha pared está impregnada de suberina. En especies sin suberina, los cloroplastos de estas células se distribuyen de forma centrípeta, de manera que la vacuola de las células de la vaina sirve para frenar la pérdida de  $CO_2$  (Sage, 2004).

Ya en 1971, Downton intentó correlacionar la posición de los cloroplastos en las células de la vaina y su ultraestructura con las reacciones de la fotosíntesis que llevan a cabo. Este autor señaló que la presencia en las células de la vaina de cloroplastos con poca grana o agranales ponía de manifiesto la falta de fotosistema II, por lo que estos cloroplastos no serían capaces de generar potencial reductor fotoquímicamente. El poder reductor probablemente lo tendría que proporcionar el

malato del mesófilo para reducir NADPH<sub>2</sub> por lo que, frecuentemente, las C<sub>4</sub> con poca grana en las células de la vaina son formadoras de malato, es decir del tipo NADP-ME o tipo PCK (ver esquema Hatch 1987). La distribución centrífuga de los cloroplastos de las células de la vaina facilitaría el acoplamiento entre los cloroplastos de la vaina y los del mesófilo para intercambiar malato y por tanto suministrar ese poder reductor. Cuando los cloroplastos de la vaina tienen grana pueden distribuirse de forma centrífuga o centrípeta, pero las especies que tienen distribución centrípeta suelen ser formadoras de aspartato (tipo NAD-ME). La presencia o no de mitocondrias próximas a los cloroplastos de las células de la vaina es otro indicio del posible subtipo de C<sub>4</sub> puesto que en las plantas NAD-ME y en las PCK, parte de las reacciones de descarboxilación del aspartato o del malato se realizan en las mitocondrias (Downton, 1971, Hatch, 1987, Sage 2004).

En el estudio ultraestructural fue de gran utilidad la el uso del permanganato potásico que fijaba mejor las estructuras membranosas, proporcionado información sobre el número y tamaño de los grana en los cloroplastos y de las características de las mitocondrias.

Los resultados obtenidos confirman la heterogeneidad que existe en las hojas de las especies de *Chenopodiaceae* con respecto a su anatomía y fisiología (Jacobs, 2001). En las otras familias estudiadas también se han encontrado variaciones de los distintos modelos. Aunque la clasificación definitiva dentro de un subtipo u otro de las distintas especies estudiadas sólo se puede completar con los datos bioquímicos y los de inmunolocalización de las enzimas específicas de cada tipo, su estudio anatómico y ultraestructural aporta datos interesantes de estas plantas capaces de adaptarse a las condiciones ambientales del Parque de Cabo de Gata-Níjar.

En cuanto a las especies CAM encontradas, hay que mencionar que por su capacidad de presentar metabolismo C<sub>3</sub>/CAM de forma facultativa han sido objeto de un estudio más profundo en otra de las contribuciones de este libro.

La clasificación de las plantas de acuerdo con los datos histológicos detallada en la Tabla 1 está en general de acuerdo con la obtenida de los datos bioquímicos o de composición isotópica. Sin embargo existen casos de especies que pueden tener un metabolismo intermedio entre C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> o C<sub>3</sub>/CAM. En ellos los datos histológicos son característicos de un tipo u otro pero no ponen de manifiesto esta posible alternancia.

## Agradecimientos

A Julio López Gorgé por animarnos a participar en este proyecto multidisciplinar subvencionado por la Fundación Ramón Areces, del que fue inagotable fuente de inspiración.

## Referencias bibliográficas

- CHUONG, S.D.X.; FRANCESCHI, V.R. y EDWARDS, G.E., 2006. «The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis in *Chenopodiaceae* species». *Plant Cell*, 18, 2207-2223.
- EDWARDS, G.E.; FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. y C.; OSMOND, B., 2001. «What Does It Take to Be C<sub>4</sub>? Lessons from the Evolution of C<sub>4</sub> Photosynthesis». *Plant Physiol.*, 125, 46-49.
- HATCH, M.D., 1987. «C<sub>4</sub> photosynthesis; a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure». *Biochem. Biophys. Acta*, 895, 81-106.
- HIBBERD, J.M. y QUICK, W.P., 2002. «Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants». *Nature*, 415, 451-454.
- JACOBS, S.W.L., 2001. «Review of leaf anatomy and ultrastructure in the *Chenopodiaceae* (*Caryophyllales*)». *J. Torrey Bot. Soc.*, 128, 3, 236-253.
- KADEREIT, G.; BORSCH, T.; WEISING, K. y FREITAG, H., 2003. «Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the Evolution of C<sub>4</sub> Photosynthesis». *Int. J. Plant Sci.*, 164, 959-986.
- KANAL, R. y EDWARDS, G.E., 1999. «The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis». En: *C<sub>4</sub> plant biology*, 49-87. Eds. Sage, R.S. y MONZÓN, R.K. San Diego, CA, USA Academic press.
- LAWLOR, D.W., 2001. *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes*, 3<sup>rd</sup> edition. Springer Verlag, New York.
- LÓPEZ, J. y DEVESA, J.A., 1991. «Contribución al conocimiento de la anatomía foliar de las *Aveneae* (*Poaceae*, *Pooideae*) del centro-oeste de España». *Anales Jar. Bot. Madrid*, 28, 2, 171-187.
- NELSON, E.A.; SAGE, T.L., y SAGE, R.E., 2005. «Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism». *Funct. Plant Biol.*, 32, 409-419.
- PYANKOV, V.; ZIEGLER, H.; KUZ'MIN, A. y EDWARDS, G., 2001. «Origin and evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the tribe Salsola (Chenopodiaceae) based on anatomical and biochemical types in leaves and cotyledons». *Plant Syst. and Evol.*, 230, 43-74.
- RAWSTHORNE, S., 1992. «C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression». *Plant J.*, 2, 267-274.
- SAGE, R., 2004. «The evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis». *New Phytol.*, 161, 341-370.
- SAYED, O.H., 2001. «Review: Crassulacean Acid Metabolism 1975-2000, a check list». *Photosynthetica*, 39, 3, 339-352.
- TEERI, J. A., 1982. «Photosynthetic variation in the Crassulaceae». En: *Crassulacean Acid Metabolism*, 244-259. Eds. I.P. Ting and M.Gibbs. America Society of Plant Physiologists.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; FREITAG, H., y EDWARDS, G., 2001. «Kranz anatomy is not

essential for terrestrial C<sub>4</sub> plant photosynthesis». *Nature*, 414, 29, 543-546.  
VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; ARTYUS-

HEVA, E.G.; FREITAG, H. y EDWARDS, G.E., 2002. «Proof of C<sub>4</sub> photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae)». *Plant J.*, 31, 5, 649-662.

# Análisis estructural del aparato fotosintético en plantas C<sub>4</sub> y CAM mediante microscopía de fluorescencia/confocal

JUAN DE DIOS ALCHE RAMÍREZ,  
ADELA OLMEDILLA ARNAL  
y MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ GARCÍA\*

## Resumen

Se ha realizado un estudio histológico de hojas de diversas plantas C<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>/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<sub>4</sub>, 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>/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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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 oppositifolia* 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  $\mu$ m) 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**

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

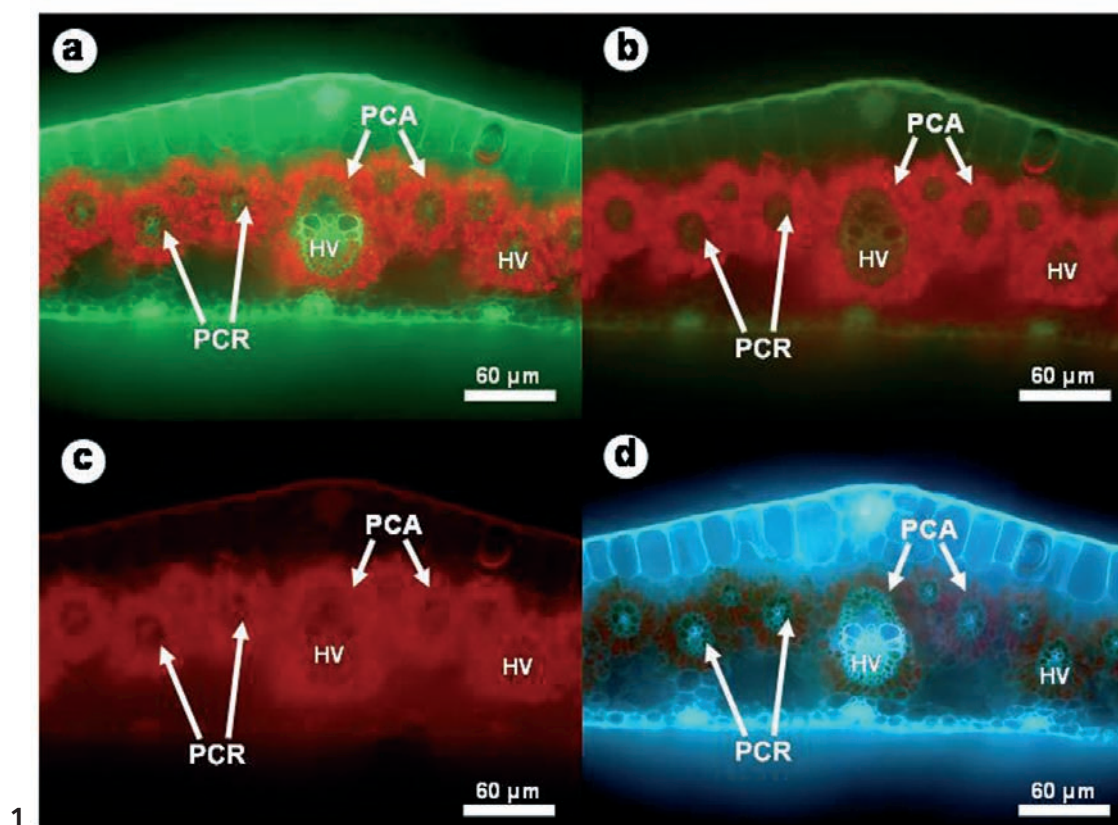
En general, las plantas  $C_4$  poseen la estructura «Kranz», claramente discernible en cuanto que el mesófilo y la vaina se localizan formando anillos concéntricos alrededor de los haces vasculares. Sin embargo en muchos casos, esta estructura típica no es tan claramente identificable, o presenta ligeras 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).

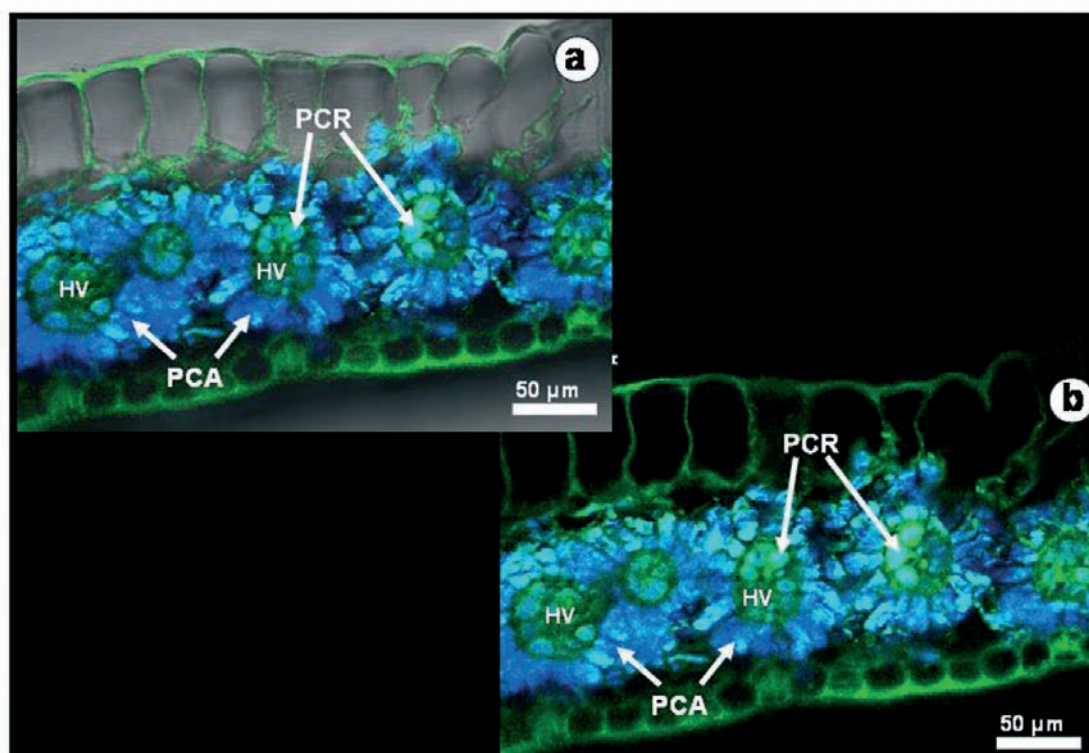
### *Cyperus rotundus* (Cyperaceae)

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 las 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



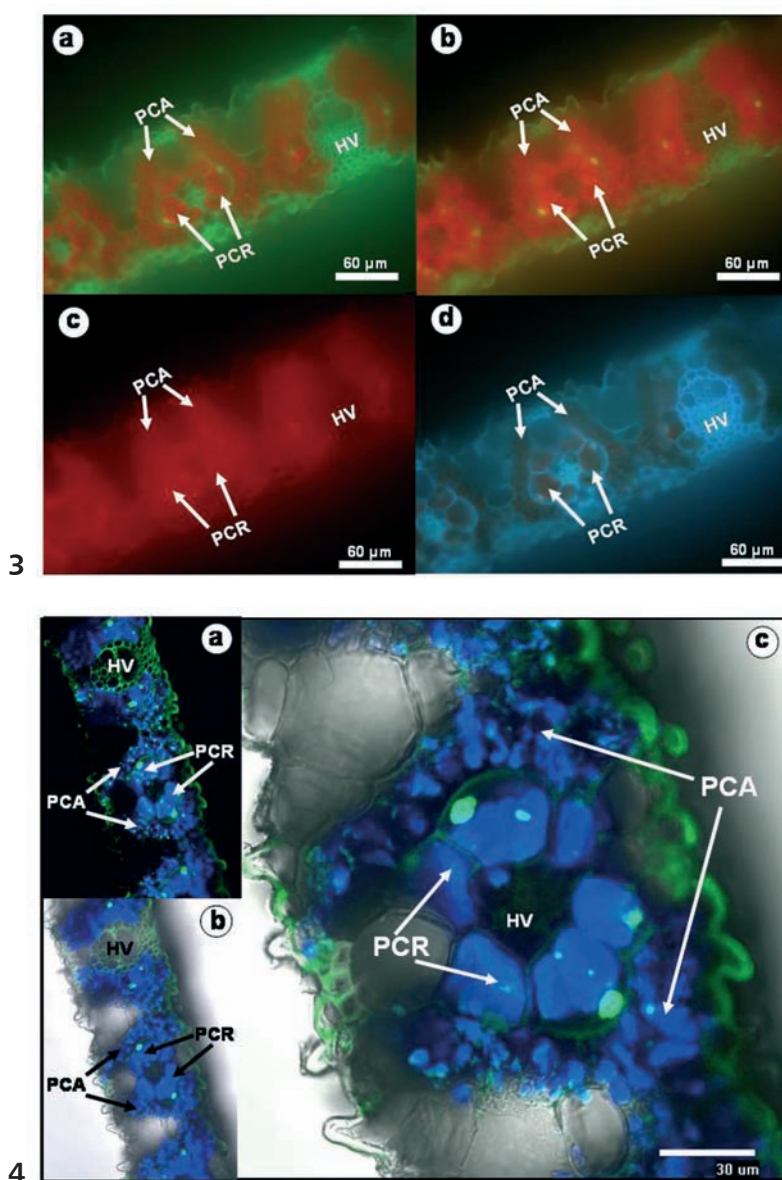
2

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 dactylon* (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 (Wat-

son 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.

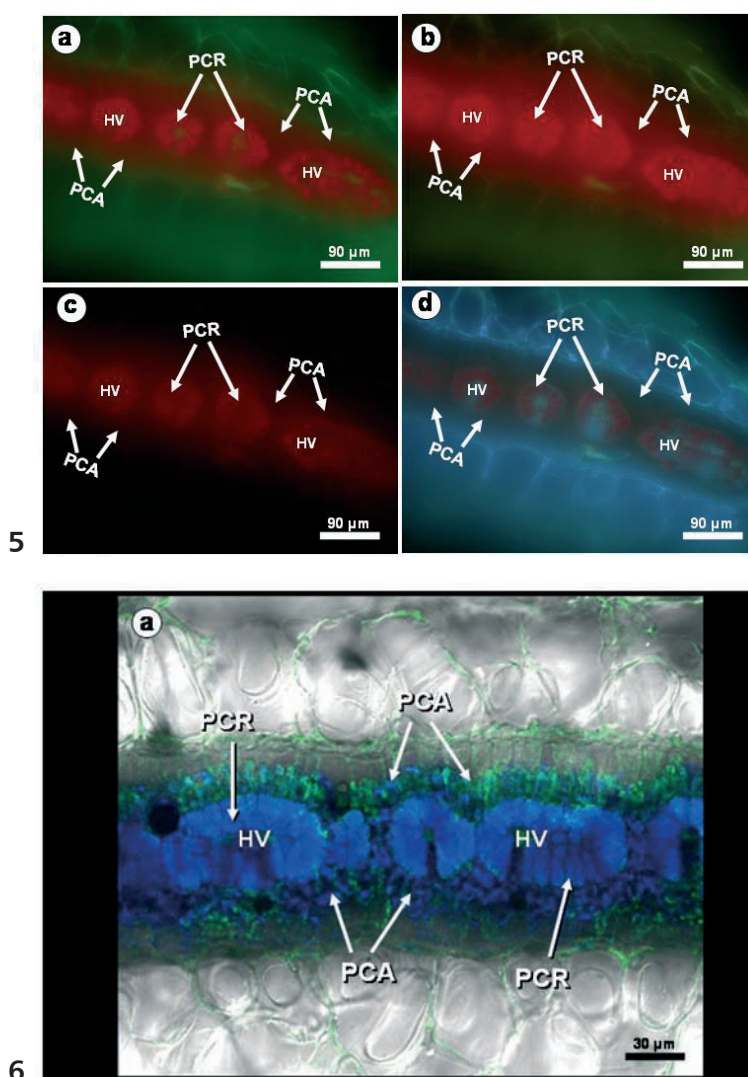


FIGURAS 3 y 4. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Cynodon dactylum* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 3a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con (Fig. 4b y c) y sin luz transmitida (Fig. 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  $C_4/CAM$  (Voznesenskaya *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.

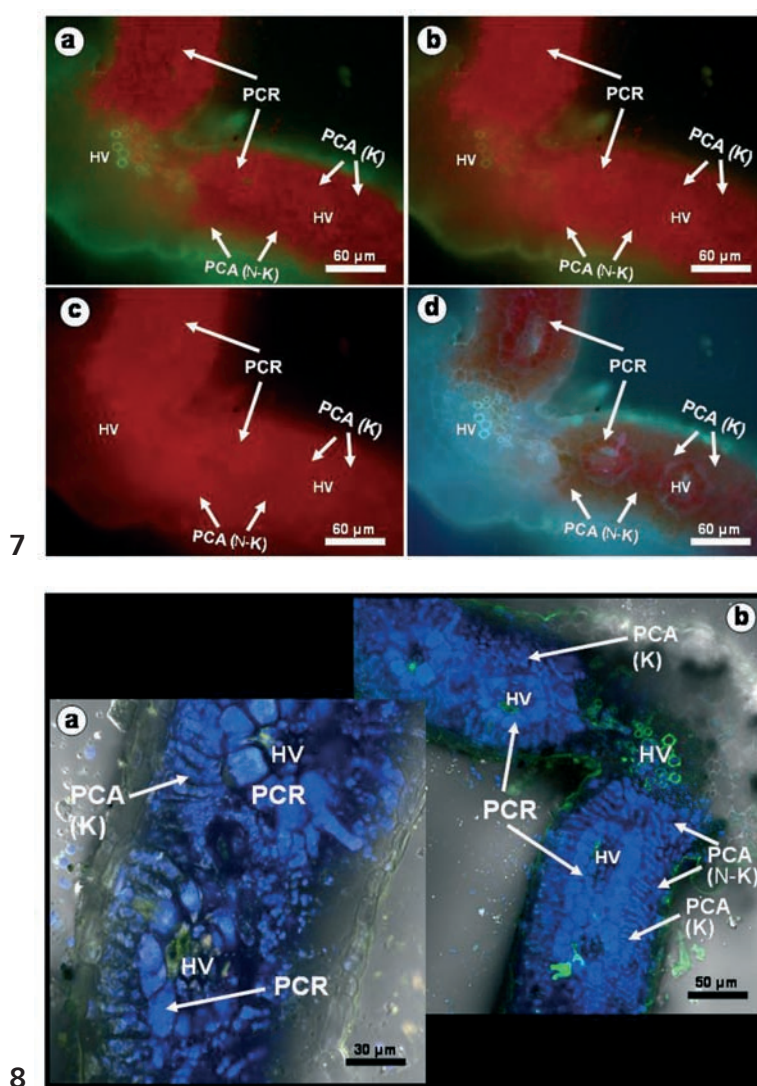


FIGURAS 5 y 6. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Atriplex halimus* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 5a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con luz transmitida (Fig. 6). PCR: Photosynthetic 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.

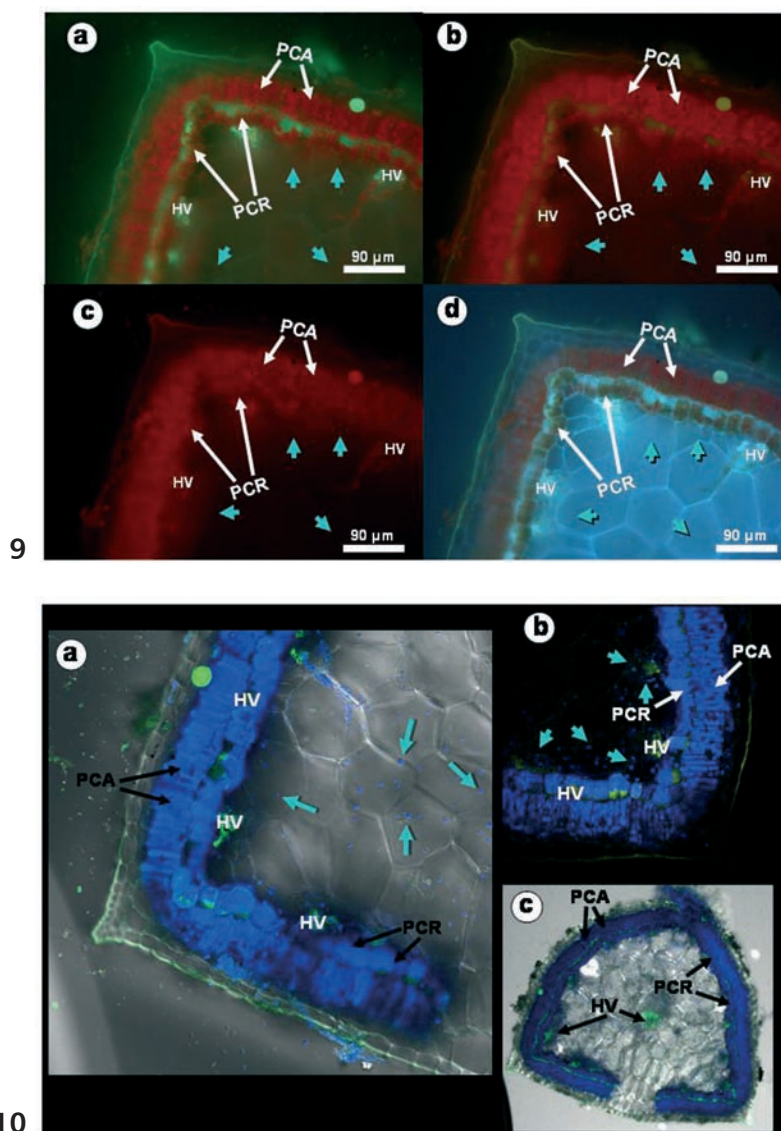


FIGURAS 7 y 8. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Amaranthus blitoides* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 7a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con luz transmitida (Fig. 8). PCR: Photosynthetic 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 oppositifolia* 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 clorénquimatosas (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

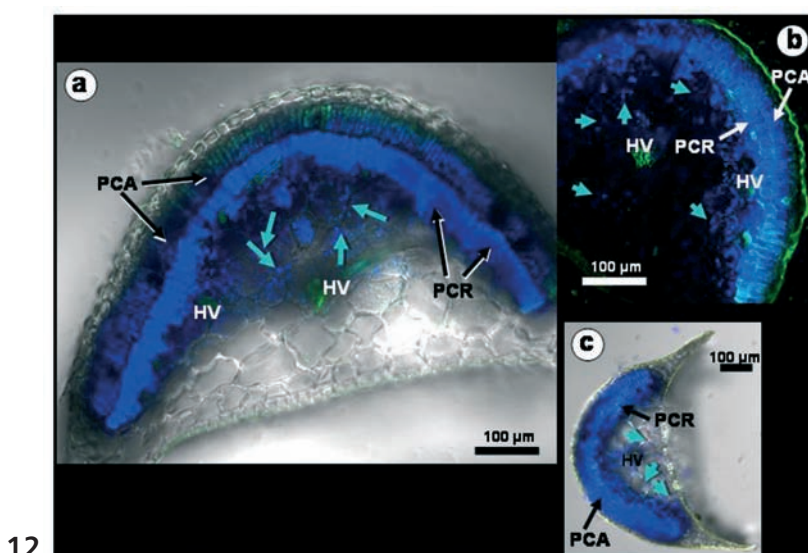
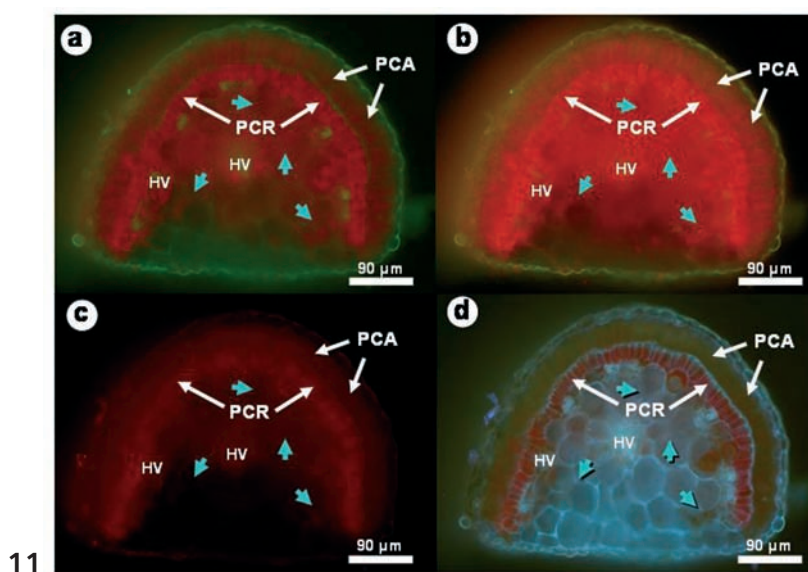
subepidermales. Se observa un haz vascular mayor, inmerso en el centro del tejido que almacena agua y que forma la región central de la hoja. En dicho tejido se observan igualmente numerosos cloroplastos. También se observan haces conductores menores justo bajo la vaina. La autofluorescencia mostrada 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



FIGURAS 9 y 10. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Salsola oppositifolia* 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  $\text{CO}_2$  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.

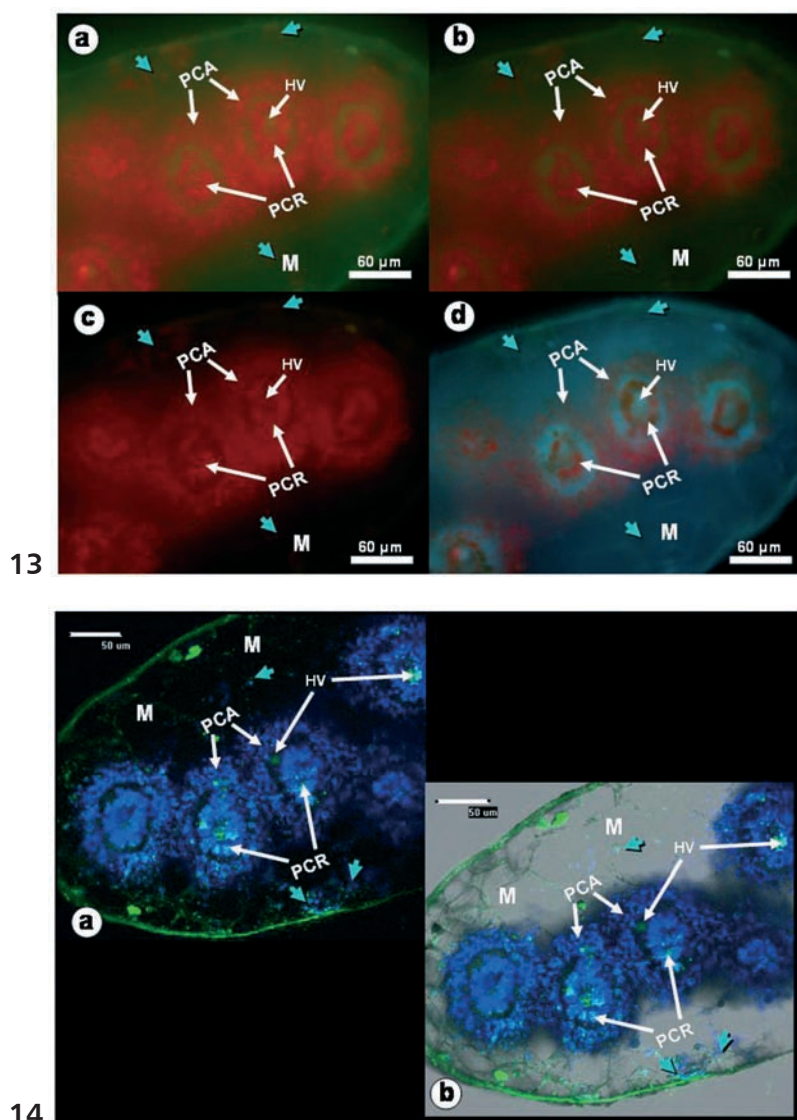


FIGURAS 11 y 12. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Salsola vermiculata* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 11a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal con (Fig. 12a, c) y sin luz transmitida (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.



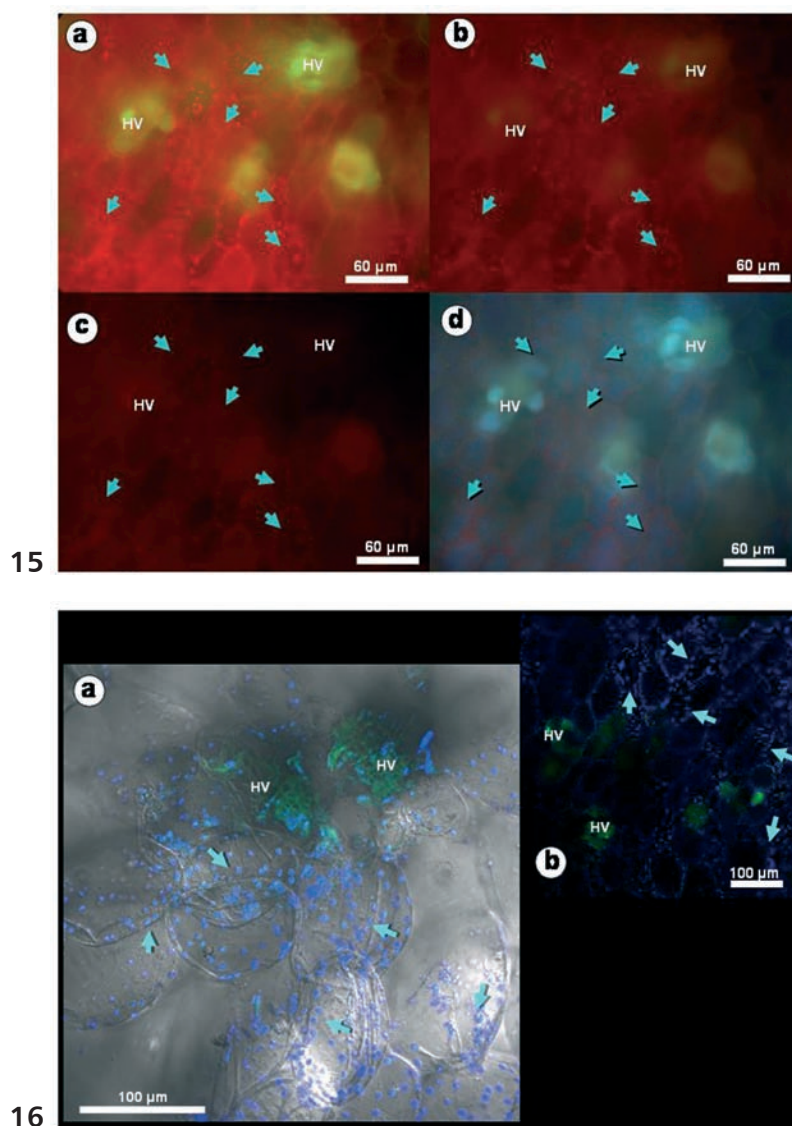
FIGURAS 13 y 14. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Portulaca oleracea* observada mediante microscopía de epifluorescencia con irradiación azul, azul/violeta, roja y ultravioleta (Fig. 13a, b, c y d respectivamente) y microscopía confocal (Fig. 14a) y microscopía confocal y luz 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  $\text{CO}_2$  son similares a las de las plantas  $C_4$ , aunque en este caso la fijación del  $\text{CO}_2$  y su asimilación no están separadas espacialmente, sino en el tiempo. Las plantas CAM se dan esencialmente en regiones áridas. La apertura de los estomas para la captación del  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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



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. 16a y b respectivamente). Las flechas azules muestran la localización de cloroplastos presentes en células indiferenciadas del mesófilo. HV: haces vasculares.

mesófilo homogéneo con numerosas 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, RuBP-CO, PEPC, NAD-ME y NADP-ME (ej. Castrillo *et al.*, 1997; Voznesenskaya *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2005), ii) 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 une 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 especímenes vegetales, que incluyen el uso de colorantes tan comunes como la safranina, hematoxilina, Fast Green, Orange G, Alcian Blue... Numerosos textos documentan las posibles utilidades 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

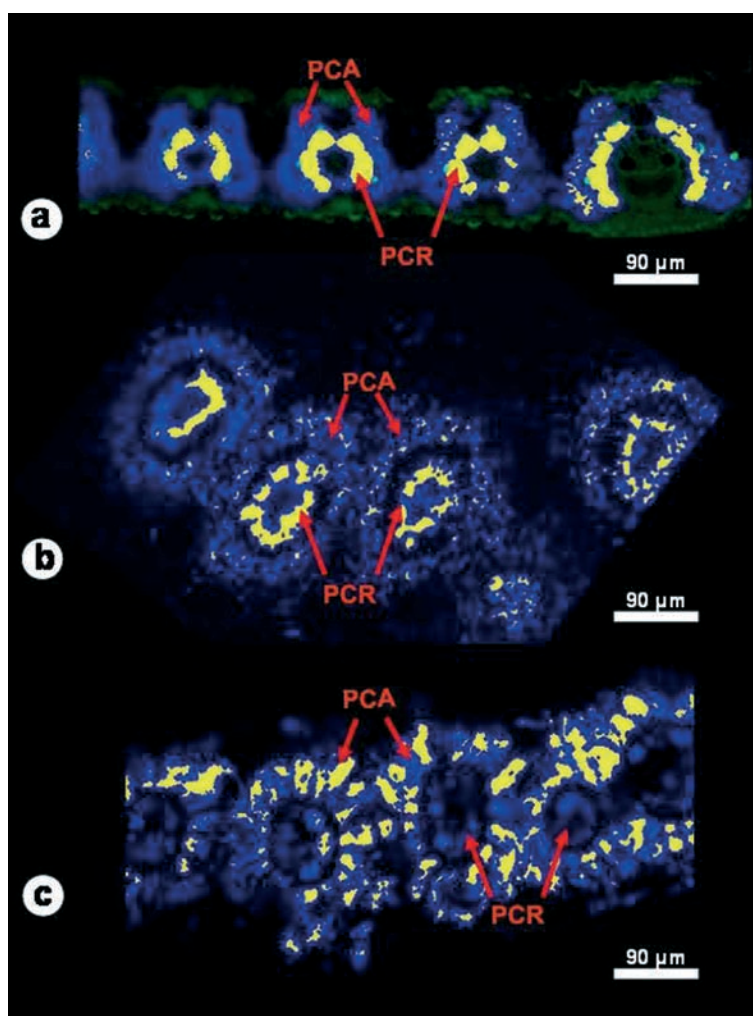


FIGURA 17. Autofluorescencia en secciones transversales de hojas de *Cynodon dactylon* (a), *Portulaca oleracea* (b) y *Cyperus rotundus* (c) observada mediante microscopía confocal. En amarillo se muestran las regiones con saturación del nivel de fluorescencia emitida. PCR: Photosynthetic Carbon Reduction 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 für Systematische Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 95, 226-255.
- CASTRILLO, M.; ASO, P.; LONGART, M. y VERMEHREN, A., 1997. «In situ immunofluorescent localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in mesophyll of C<sub>4</sub> 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 C<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>? Lessons from the Evolution of C<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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 C<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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.

# El suelo, regulador fisicoquímico de elementos traza para las plantas

M<sup>a</sup> DOLORES MINGORANCE ÁLVAREZ\*

## Resumen

Las funciones del suelo incluyen las de proveer anclaje y soporte físico a las plantas y reserva de nutrientes y agua. Dentro de los nutrientes, los elementos traza juegan un papel primordial en el desarrollo vegetal y en su mayor parte son absorbidos del suelo donde se encuentran bajo diferentes formas químicas. Se pueden encontrar como especies solubles, fácilmente disponibles, débilmente unidas a las partículas sólidas o fuertemente unidas o precipitadas por lo que son insolubles y no disponibles para las plantas. La disponibilidad de los elementos traza está regida por los parámetros edafológicos y por su tendencia a reaccionar con los componentes del suelo. Por tanto, las fases activas del suelo (arcilla, óxidos de Fe y Mn procedentes de la meteorización y materia orgánica) y las reacciones fisicoquímicas que se producen entre la fase sólida y la solución del suelo son las que rigen su disponibilidad. Desde el punto de vista práctico, la estimación de la disponibilidad de los elementos traza para las plantas se lleva a cabo mediante procesos de extracción química junto con la caracterización fisicoquímica del suelo.

## Summary

The role of the soil includes physical support for plants as well as water and nutrients delivery. Most of the nutrients are trace elements which exist in many different chemical forms within the soil. These pools range from soluble, readily available forms, to weakly bound forms that are in rapid equilibrium with soluble pools, to strongly bound or precipitated forms that are very insoluble and become available only over long time periods. Trace element solubility and availability in soil are governed by fundamental chemical reactions between trace element and soil components as well as the soil active fractions (clay, oxides of Fe and Mn and organic matter). Practically, the availability assessment of the trace elements by plants is performed by chemical extraction and their interpretation needs the soil edaphic parameters.

El suelo, aunque constituye una delgada capa de la corteza terrestre, es el medio donde se producen la mayoría de los procesos relacionados con el desarrollo vegetal. Es ampliamente reconocido que las interrelaciones suelo-planta son muy complejas y hay que contemplarlas de un modo dinámico ya que el suelo es un sistema abierto que soporta un continuo intercambio de materia y energía con la atmósfera, hidrosfera y biosfera, es decir, es una parte de un sistema más complejo en el que todos los procesos son interdependientes.

Las plantas  $C_4$  y CAM constituyen un grupo importante de especies, adaptadas a ambientes con altas temperaturas, iluminación intensa y escasez de agua. La fertilidad del suelo en estas condiciones es un factor limitante en la productividad de estas plantas ya que suele ser bastante baja debido a la ausencia de agua y el exceso Na, Ca, etc, que rebajan el potencial químico de los demás nutrientes en el suelo. Por otro lado, los suelos áridos pueden ser muy pedregosos y poco profundos, por la presencia de capas endurecidas: horizontes petrocálcicos (caliches), duripanes, y otros. Como consecuencia, aunque los nutrientes pueden estar presentes en cantidades suficientes, su disponibilidad es baja y una mejora en la calidad del suelo es la estrategia que asegura la supervivencia de estas especies. La composición del suelo, por tanto, afecta a la composición mineral de las plantas, pero son las propiedades fisicoquímicas del suelo las que realmente dominan la disponibilidad de los nutrientes, a pesar de que éstos se encuentren presentes en el suelo. Por tanto, ya que la función química más importante del suelo, en este contexto, es el intercambio de iones, este capítulo intenta dar una visión general sobre este aspecto en relación con los llamados micronutrientes o elementos traza.

\* Departamento Geoquímica Ambiental. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1, 18008-Granada, España.

## Suelo

El suelo es uno de los elementos clave en todos los ecosistemas terrestres en los que cumple cinco funciones esenciales. 1) el suelo es el soporte físico para el crecimiento de las plantas, les proporciona el agua, el aire y los nutrientes esenciales para su desarrollo y las protege de ciertos elementos fitotóxicos y de cambios bruscos de temperatura. Las propiedades del suelo son las que determinan el tipo de vegetación de un ecosistema y la producción de biomasa. 2) el suelo es el factor principal que controla el flujo del agua en el ciclo hidrológico así como de las especies químicas dentro de los ciclos biogeoquímicos. Aunque es una capa muy delgada, su composición y propiedades pueden ser muy diferentes de las del substrato geológico y, en su ausencia, los ciclos hidrológicos y biogeoquímicos serían completamente distintos. 3) el suelo actúa como sistema de reciclado natural donde los productos de desecho son transformados en otros compuestos disponibles para las generaciones siguientes, o bien, son retenidos actuando como sumidero, i.e.  $\text{CO}_2$ . 4) es el hábitat de una gran variedad de organismos vivos, desde microorganismos hasta reptiles. Por último, 5) es el soporte para la infraestructura, necesario para el desarrollo de la vida humana. Resumiendo, es la interfase donde se producen los procesos de interacción entre la litosfera, atmósfera, hidrosfera y biosfera.

Las definiciones de suelos son muy variadas dependiendo de su función. Desde el punto de vista agrícola, i.e., se define como una entidad natural dinámica de la superficie de la tierra donde crecen las plantas, compuesto de minerales, materiales orgánicos y organismos vivos (Brady and Weil, 2002).

El suelo es un medio heterogéneo muy complejo que consta de una fase sólida (la matriz del suelo) constituida por minerales y materia orgánica y una fase fluida (la solución y el aire del suelo) que interaccionan entre ellas y con los elementos que entran en el sistema del suelo (Alloway, 1995). La proporción relativa de estos cuatro componentes le confiere sus propiedades, su comportamiento y su productividad. En general, el 45% del suelo es el componente mineral, el 5 % la fracción orgánica, un 25% lo constituye el aire y el otro 25% el agua alojada en los poros.

La fase acuosa del suelo, denominada solución del suelo, es en su mayoría agua que contiene especies químicas procedentes de los procesos químicos y bioquímicos del suelo y del intercambio con la hidrosfera y

biosfera. Además, contiene oxígeno y dióxido de carbono disueltos. Es el medio que proporciona agua a las plantas y es el vehículo de transporte e intercambio de los nutrientes entre las partículas del suelo y las raíces de las plantas. Normalmente, debido al pequeño tamaño de las partículas del suelo y la presencia de poros, la fase acuosa no es totalmente independiente de la fase sólida. La disponibilidad de agua, y por tanto de nutrientes, está regida por gradientes de potencial hidráulico (mátrico, gravitacional y osmótico). Este aspecto es tratado en otro capítulo de este libro. La mayoría de los elementos minerales se encuentra presentes como iones,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y pequeñas cantidades de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ . Estos tres últimos cationes se suelen encontrar parcialmente hidrolizados o en forma de complejos con ligandos orgánicos. Los aniones mayoritarios son  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$  que pueden estar al mismo tiempo unidos a  $\text{H}^+$  o a otros iones como por ejemplo el  $\text{Ca}^{2+}$ . La capacidad de los suelos para adsorber/desorber elementos traza de las soluciones acuosas es de especial interés para la agricultura, dentro del ámbito de la fertilidad del suelo, y en temas ambientales, como la remediación y descontaminación de suelos.

## Elementos traza

La nutrición vegetal se relaciona con el abastecimiento y absorción de compuestos químicos necesarios para el crecimiento y metabolismo de las plantas. Los compuestos requeridos por los vegetales se denominan nutrientes.

El 90-95% del peso seco del material vegetal está constituido por C, O e H, que son los principales constituyentes de los compuestos orgánicos, y el 5-10% restante corresponde a otros elementos cuya presencia es esencial para completar su desarrollo normal y su ciclo biológico. Debido a su papel fisiológico se les llama elementos esenciales y, de acuerdo a la concentración en que son requeridos por la planta, se clasifican en macro y micronutrientes (Tabla 1). Esta clasificación tiene una validez relativa, ya que en algunos casos, ciertos macronutrientes se acumulan en cantidades menores que otros micronutrientes. Por otro lado, además de los nutrientes se pueden encontrar en la planta otros elementos, sin función biológica conocida hasta ahora, y otros cuya presencia en la planta conduce a disfunciones, ya que tienden a acumularse y son altamente tóxicos (Cd, Hg, Pb, Sn y Bi).

TABLA 1

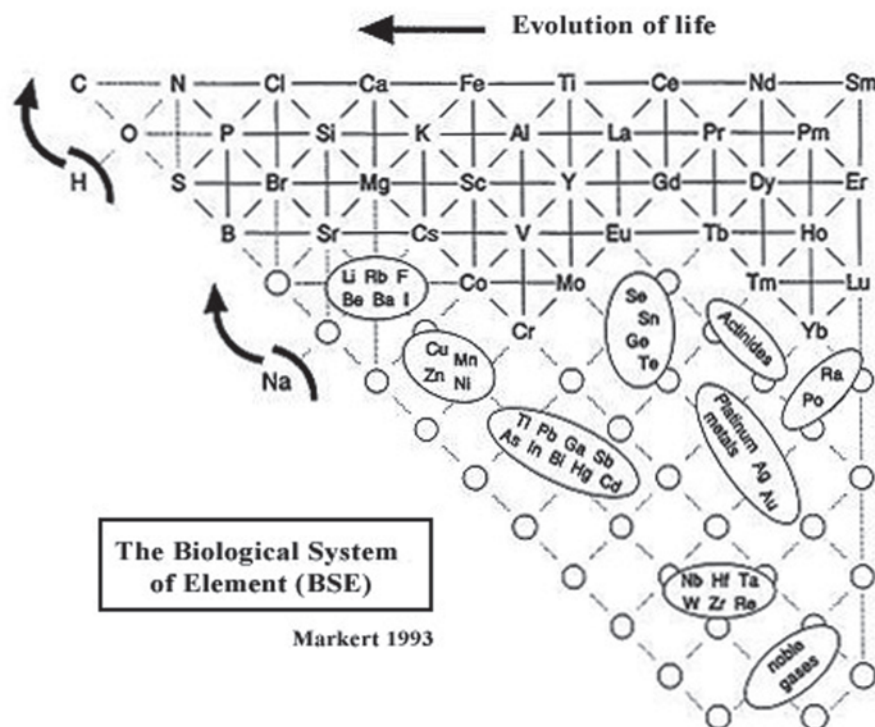
**Resumen de las funciones más importantes de los nutrientes inorgánicos en las plantas**  
(adaptada de Taiz y Zeiger, 1998)

<i>Elemento</i>	<i>Especie química absorbida</i>	<i>Contenido normal</i>	<i>Funciones</i>
<i>Macronutrientes (%)</i>			
Carbono	CO <sub>2</sub>	44	Componente de compuestos orgánicos
Oxígeno	H <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub>	44	Componente de compuestos orgánicos
Hidrógeno	H <sub>2</sub> O	6	Componente de compuestos orgánicos
Nitrógeno	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1-4	Aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, clorofila y coenzimas
Potasio	K <sup>+</sup>	0,5-6	Enzimas, aminoácidos, y síntesis de proteínas Activador de muchas enzimas
Calcio	Ca <sup>2+</sup>	0,2-3,5	Apertura y cierre de estomas Calcio de las paredes celulares Cofactor enzimático Permeabilidad celular
Fósforo	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,1-0,8	Componente de la calmodulina, un regulador de la membrana y de las actividades enzimáticas Formación de compuestos fosfatados de «alta energía» (ATP y ADP)
Magnesio	Mg <sup>2+</sup>	0,1-0,8	Ácidos nucleicos. Fosforilación de azúcares Varios coenzimas esenciales, fosfolípidos
Azufre	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,05-1	Parte de la molécula de clorofila Activador de muchas enzimas Algunos aminoácidos y proteínas Coenzima A
<i>Micronutrientes (mg kg<sup>-1</sup>)</i>			
Hierro	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	25-300	Síntesis de clorofila, citocromos y nitrogenasa
Cloro	Cl <sup>-</sup>	100-10.000	Ósmosis y equilibrio iónico, probablemente esencial en reacciones fotosintéticas que producen oxígeno
Cobre	Cu <sup>2+</sup>	4-30	Activador de ciertas enzimas
Manganeso	Mn <sup>2+</sup>	15-800	Activador de ciertas enzimas
Zinc	Zn <sup>2+</sup>	15-100	Activador de ciertas enzimas
Molibdeno	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,1-5,9	Fijación del nitrógeno. Reducción del nitrato
Boro	BO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	5-75	Influye en la utilización del calcio
<i>Elementos esenciales para algunas plantas u organismos</i>			
Cobalto	Co <sup>2+</sup>	Trazas	Requerido por microorganismos que fijan el nitrógeno
Sodio	Na <sup>+</sup>	Trazas	Equilibrio osmótico e iónico. No es esencial para muchas plantas. Requerido por algunas especies del desierto y marismas. Es esencial para plantas C <sub>4</sub> y CAM, puede aumentar la actividad de la PEP carboxilasa
Silicio	SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	0,2-10%*	Es un componente de la pared celular. Protege contra plagas y estrés ambiental. Beneficioso para plantas C <sub>4</sub> y CAM
Níquel	Ni <sup>2+</sup>	Trazas	Está asociado a la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea, produciendo CO <sub>2</sub> y NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

\* Esta concentración es equivalente a la de otros macronutrientes, sin embargo no está incluido como elemento esencial. Es considerado como «quasi-esencial».

Teniendo en cuenta los aspectos bioquímicos y fisiológicos de la presencia de los elementos químicos en las plantas, Markert (1994) proporcionó su configuración en lo que denominó Sistema Biológico de los Ele-

mentos (Figura 1). Los elementos encerrados en círculos son grupos con funciones biológicas similares que necesitan más investigación para definir su posición exacta. El resto de los elementos están unidos por líneas



Los ET presentes en los suelos proceden fundamentalmente del material original (rocas y minerales) que ha dado lugar a la formación del suelo (Adriano, 2001); de aportaciones externas como fertilizantes, productos de encalado, plaguicidas y aguas residuales; y de residuos industriales, productos de combustión de materiales fósiles, materiales volcánicos y por deposiciones atmosféricas. Los materiales de origen proporcionan el nivel geoquímico de ET en los suelos y por

TABLA 2

Procedencia de los elementos traza relacionada con la composición del material mineral original (mg kg<sup>-1</sup>)

Elemento	Granito	Basalto	Esquisto	Caliza	Arenisca	Suelos
Al	77000	88000	88000	90000	43000	71000
As	1,5	1,5	13	1	1	6
Cd	0,09	0,13	0,22	0,028	0,05	0,35
Co	1	35	19	0,1	0,3	8
Cr	4	90	90	11	35	70
Cu	13	90	39	5,5	30	30
Fe	27000	56000	48000	17000	29000	40000
Hg	0,08	0,012	0,012	0,18	0,29	0,06
Mn	400	1500	850	620	460	1000
Mo	2	1	2,6	0,16	0,2	1,2
Ni	0,5	150	68	7	9	50
Pb	24	3	23	5,7	10	35
Se	0,05	0,05	0,5	0,03	0,01	0,4
Sn	3,5	1	6	0,5	0,5	4
Zn	52	100	120	20	30	90

ello existe una gran variabilidad en el contenido de diversos metales en diferentes suelos como se muestra en la Tabla 2. De ella se desprende que un elemento como el As multiplica su contenido por 13 al pasar de una roca sedimentaria caliza a una metamórfica, como el esquisto, en el que se produce una fuerte concentración. Un elemento como el Cr incrementa su contenido en más de veinte veces al pasar de una roca ígnea ácida, como el granito, a una básica, como el basalto. Algo similar ocurre con el Cu. Esto es aún más significativo para el Ni. En el caso del Pb sucede todo lo contrario, es más abundante en las rocas ácidas que en las básicas. A la vista de esta tabla también llama la atención que Pb y Cd estén presentes en el suelo en concentraciones mayores que en las rocas de partida lo cual se debe a la contaminación antropogénica.

### Disponibilidad de los elementos traza

Los ET del suelo se encuentran: 1) formando parte de los minerales primarios cuya meteorización puede tardar miles de años en producirse y en consecuencia, no son asimilables para las plantas; 2) formando parte de arcillas por sustituciones isomórficas del Fe y Al de las capas octaédricas; 3) ocluidos en óxidos de Fe y Mn; 4) formando complejos con la materia orgánica; 5) como cationes de cambio; y, finalmente, 6) como fases solubles presentes en la solución del suelo, en forma iónica o bien formando complejos, siendo estos fácilmente absorbidos por las plantas.

La concentración total de ET en el suelo, por tanto, no refleja los niveles disponibles ya que solamente una parte pequeña se encuentra en forma soluble y como consecuencia, disponible para las plantas (Lassat, 2001).

Las formas solubles aparecen como resultado de reacciones químicas entre los materiales inorgánicos y orgánicos presentes en el suelo, y las fases acuosa y gaseosa (Figura 2).

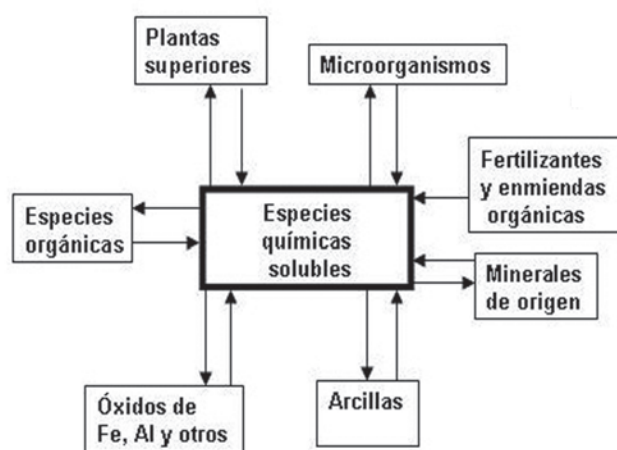


FIGURA 2. Procedencia de las especies químicas disponibles para las plantas en la solución del suelo.

En definitiva, según la especie química en que se encuentre presente el ET en las diferentes fases del suelo, así será la disponibilidad relativa por las plantas y, por tanto, la incorporación en la biomasa (Tabla 3).

TABLA 3

## Relación entre la especie química del ET y la disponibilidad para la planta

<i>Forma de retención en el suelo</i>	<i>Disponibilidad relativa</i>
Iones en solución del suelo	Fácilmente disponible
Ión en el complejo de cambio	Relativamente disponibles, por su pequeño tamaño, alta carga, quedan fuertemente adsorbidos
Complejos orgánicos	Menos disponibles
Precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre alguna alteración química
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Parte de la estructura mineral	Disponible después de la meteorización

La fertilidad del suelo se debe corresponder con su capacidad de almacenar grandes cantidades de nutrientes cuando las necesidades de las plantas son más bajas o no existen, y disponer de grandes cantidades de nutrientes en solución mientras los necesitan las plantas.

La biodisponibilidad se define como la fracción del metal que puede interactuar con un organismo biológico y ser incorporado a su estructura (Vangronsveld y Cunningham, 1998).

La movilidad es un fenómeno variable que depende de unas condiciones muy determinadas del suelo que, en caso de alterarse, conducen a la liberación o retención de estos elementos. La capacidad de un suelo de suministrar nutrientes depende de las propiedades físicas, químicas y biológicas de éste y del clima. La complejidad de estos procesos se pueden sintetizar teniendo en cuenta dos aspectos primordiales: las fases activas del suelo (arcilla y óxidos de Fe y Mn procedentes de la meteorización y materia orgánica) y las reacciones fisicoquímicas que se producen entre la fase sólida y la solución del suelo. Estas últimas son estrechamente dependientes del pH y del potencial redox del sistema, que a su vez, dependen de la textura y estructura del suelo. Las fases activas proporcionan al suelo una de sus propiedades más importantes, la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

### Fases activas del suelo que obran en la disponibilidad de elementos traza

Son componentes sólidos del suelo cuya naturaleza química y estructura les confiere una actividad química variable dependiendo de las propiedades del ET y de las condiciones de la solución del suelo (Russell, 1973). Se consideran fases activas la arcilla, la materia orgánica y los óxidos de Fe y Mn.

La fracción de las arcillas está constituida por un conjunto de minerales de pequeño tamaño de partícula pertenecientes a la subclase de los filosilicatos. Son aluminosilicatos hidratados, en algunos casos, heredados de los materiales originarios, pero que, generalmente, aparecen en el suelo como producto de la meteorización de los mismos. Las unidades principales son disposiciones bidimensionales de tetraedros con átomos de silicio-oxígeno y disposiciones bidimensionales de octaedros de Al y Mg con grupos hidroxilo. Las diferentes formas de unión de estas capas dan lugar a minerales con propiedades y comportamientos diferentes frente a la adsorción e intercambio de ET. Se caracterizan por tener una alta superficie específica accesible a los iones y moléculas, y por tener cargas negativas en su superficie. Ambas características son responsables de una fracción de la CIC del suelo y de la retención de ET evitando su lixiviación (Kataba-Pendias, 2000). Estas propiedades las divide en clases: las del grupo de la caolinita, eléctricamente neutras cuya carga y capacidad de intercambio dependen del pH; arcillas micáceas, con alta carga negativa parcialmente equilibrada por sustituciones isomórficas y por tanto, con baja CIC; las de menor carga superficial, esmectitas o monmorillonitas, cuya CIC es alta; y las vermiculitas, de carga superficial intermedia pero con la CIC más alta. Las partículas de arcilla no se encuentran como tales en el sustrato, sino que están íntimamente ligadas con la materia orgánica formando el complejo arcilla-humus.

En cuanto a la materia orgánica, aunque generalmente constituye menos del 5% de la composición del suelo, determina en un alto grado la productividad de éste. Es una mezcla compleja de compuestos orgánicos, incluyendo organismos vivos (biomasa del suelo), residuos que se descomponen fácilmente, y compuestos muy estables y resistentes a la degradación (humus).

Por su contenido relativamente alto de grupos funcionales ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ) tiene gran afinidad por los iones metálicos formando complejos órgano-metálicos. Por lo tanto las plantas, al no absorber complejos de tamaño grande pueden sufrir deficiencias de ET en presencia de grandes cantidades de materia orgánica. Además, la materia orgánica es fuente de energía para los microorganismos; es un reservorio de nutrientes y especies químicas y tienen un gran peso en las propiedades del suelo. Su influencia en éstas últimas se centra en ser responsable de la formación y estabilización de los agregados del suelo, especialmente, por parte de las sustancias no-húmicas. La fracción húmica, por otra parte, reduce la plasticidad, cohesión y adherencia de las partículas de arcilla, proporcionándoles una estructura óptima para el desarrollo vegetal. La capacidad de retención de agua también se ve afectada por la materia orgánica ya que incrementa la tasa de infiltración y la capacidad de campo.

En relación con las propiedades químicas, el humus constituye del 50-90% de la CIC de los suelos. Al igual que las arcillas, contiene cationes en forma fácilmente disponible para las plantas. Esta capacidad, junto con su contenido en grupos funcionales ácidos y básicos, proporciona al suelo un efecto tampón ante los cambios de pH y de flujo de ET. Los ácidos húmicos atacan también a los minerales del suelo acelerando su descomposición y liberando ET como cationes de cambio. Otros ácidos orgánicos, polisacáridos y ácidos fúlvicos, ejercen un efecto quelante formando complejos estables con los ET presentes en las estructuras que los hacen menos disponibles. Las reacciones de complejación por la materia orgánica del suelo son uno de los procesos que gobiernan la solubilidad y la bioasimilación de ET. Por todas estas razones, la cantidad y calidad de la materia orgánica del suelo es un factor determinante de la calidad del suelo.

La materia orgánica puede adsorber tan fuertemente a algunos metales, como el Cu, que pueden quedar no disponibles por las plantas dando lugar a deficiencias. La estabilidad de los complejos tiende a seguir la siguiente secuencia:  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Mn} = \text{Co} > \text{Zn}$ .

El humus, que es el último estadio de la transformación de la materia orgánica, es rico en ácidos orgánicos ligeros (ácidos húmicos), modificando las propiedades de agregación de las partículas, influyendo por tanto en la estructura del suelo. También está ligada a la materia mineral (complejo arcilla-humus) como se mencionó anteriormente.

Los óxidos de Fe y Mn son, como las arcillas, productos de la meteorización de los materiales originarios y se presentan finamente diseminados en todo el suelo; son químicamente muy activos y actúan como centros de retención y precipitación de los elementos traza especialmente Cu, Pb y, en menor extensión, Zn, Co, Cr, Mo y Ni. Su actividad depende del grado de cristalización, siendo mayor en climas húmedos que en áridos. Asimismo, dependiendo del pH, pueden tener carga negativa interviniendo en los procesos de intercambio iónico.

### Reacciones fisicoquímicas implicadas en solubilizar los elementos traza

La interacción entre los distintos procesos (Figura 3) como intercambio catiónico, adsorción/desorción, precipitación/disolución, y formación de complejos, contribuyen a la distribución de los metales entre la solución del suelo y la fase sólida, siendo responsables de su movilidad y biodisponibilidad (Iskandar y Kirkham, 2001; Basta, 2004).

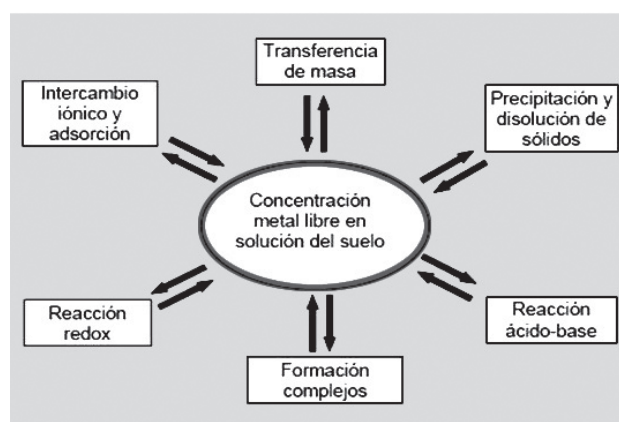


FIGURA 3. Reacciones que controlan a los ET en la solución del suelo.

Todos los suelos presentan cargas negativas en la superficie de sus constituyentes (Evans 1989), que pueden ser neutralizadas por cationes de la solución del suelo quedando débilmente adsorbidos por fuerzas electrostáticas que los hacen fácilmente intercambiables constituyendo el proceso de intercambio catiónico (adsorción no específica).

Sin embargo, existe un fenómeno de adsorción en el que el ligando se une por enlaces covalentes o iónicos quedando retenidos irreversiblemente (Alloway, 1995). El orden en que los metales tiene preferencia

por este tipo de adsorción específica es:  $\text{Cd} < \text{Zn} < \text{Cu} < \text{Pb}$ . Este tipo de adsorción es altamente dependiente del pH e involucra tanto a moléculas orgánicas (materia orgánica) como inorgánicas (óxidos de Fe, Al y Mn) y ocurre preferentemente cuando la concentración de ET es baja.

Las reacciones de precipitación/disolución están asociadas normalmente con el pH y potencial redox del suelo y se llevan a cabo generalmente con compuestos inorgánicos. Las reacciones de precipitación suceden en suelos calcáreos con baja capacidad de cambio.

Por último, la presencia en la solución del suelo de ligandos orgánicos, así como de iones hidroxilo y cloruros (estos últimos son importantes en suelos áridos, que son donde se desarrollan la mayoría de las plantas  $\text{C}_4$ ), da lugar a la formación de complejos con los ET presentes en dicha solución o unidos a las partículas sólidas.

### Propiedades del suelo que actúan en la disponibilidad de elementos traza

La capacidad de intercambio catiónico, es función del contenido de arcilla y materia orgánica, fundamentalmente (Tabla 4). En general cuanto mayor sea la capacidad de intercambio catiónico, mayor será la capacidad del suelo de fijar metales. El poder de adsorción de los distintos metales pesados depende de su valencia y del radio iónico hidratado; a mayor tamaño y menor valencia, menos fuertemente quedan retenidos. Dado que la carga neta de los materiales procede del equilibrio entre carga permanentes y carga variable, el CIC depende del pH.

TABLA 4

#### Capacidad de intercambio catiónico de los componentes del suelo

Elemento	CIC (meq <sub>c</sub> /100 g suelo)
Materia orgánica	150-500
Caolinita	3-15
Illita	10-40
Montmorillonita	50-80
Vermiculita	100-150
Cuarzo y feldespatos	1-2

El pH es el factor más importante en el control de todas las reacciones físico-químicas implicadas en la

disponibilidad de los ET (McBride, 1997; Kabata-Pendias, 2000). La mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino. En medios de pH moderadamente alto se produce la precipitación como hidróxidos. En medios muy alcalinos, pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxocomplejos. Por otra parte, algunos metales pueden estar en la disolución del suelo como aniones solubles. Tal es el caso de los siguientes metales: Se, V, As y Cr.

La asimilación de nutrientes del suelo por la planta está influenciada por el pH (Figura 4). En suelos medianamente alcalinos es posible encontrar deficiencia de B, Cu, Fe, Mn, Zn y P. En los suelos con  $\text{pH} > 9$ , uno de los problemas más acuciante es la baja disponibilidad de Fe. Estos suelos normalmente tienen un contenido alto en Fe, pero este Fe no está disponible para las plantas. La zona entre pH 5,5 a 7,5 es en la que hay más disponibilidad de ET. En los suelos ácidos, se produce una competencia entre  $\text{H}^+$  y los cationes metálicos por los sitios de intercambio. Así, Al y Mn pueden volverse muy solubles y tóxicos y, además, se reduce la capacidad de la planta para absorber P, Ca, Mg y Mo. Especialmente a  $\text{pH} < 5$  el P no está disponible para las plantas. Si el B, Cu y Zn están presentes en el suelo, pueden presentar toxicidad a estos pH.

Por otro lado, el pH también modifica la carga de los componentes de la fracción coloidal del suelo —arcillas, óxidos y materia orgánica humificada— que poseen carga dependiente del pH, la cual se hace más negativa a pH alcalino y más positiva a pH ácido (Figura 5). Por tanto, la retención de ET aumenta a medida que el pH sea más alcalino.

Las condiciones de oxidación-reducción (potencial redox) tienen efecto sobre aquellos iones que pueden tener varias valencias. Las condiciones redox pueden afectar indirectamente la movilidad de metales. Por ejemplo, en condiciones reductoras el  $\text{Fe}^{3+}$  se transforma en  $\text{Fe}^{2+}$  mucho más soluble. Así, muchos metales que están asociados o adsorbidos a hidróxidos de Fe y Mn son estables a potenciales redox (Eh) bajos. Dependiendo de las condiciones químicas, se movilizan. También, en ambientes muy reductores el Fe se puede combinar con el  $\text{S}^{2-}$  hasta convertirse en pirita. Cuando los suelos y sedimentos contienen cantidades significativas de pirita y aumenta el Eh (creación de condiciones más oxidantes) el  $\text{S}^{2-}$  se oxida a  $\text{SO}_4^{2-}$  liberando cantida-

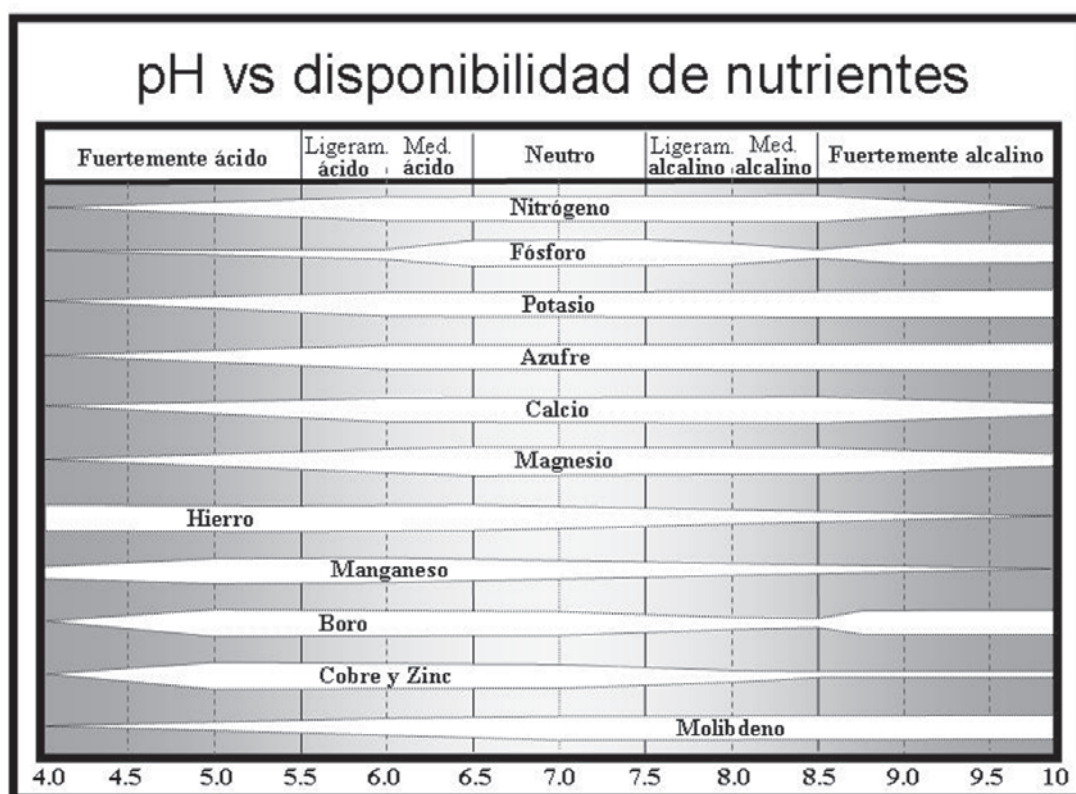


FIGURA 4. Disponibilidad de los ET en función del pH del suelo (Brady y Weil, 2002).

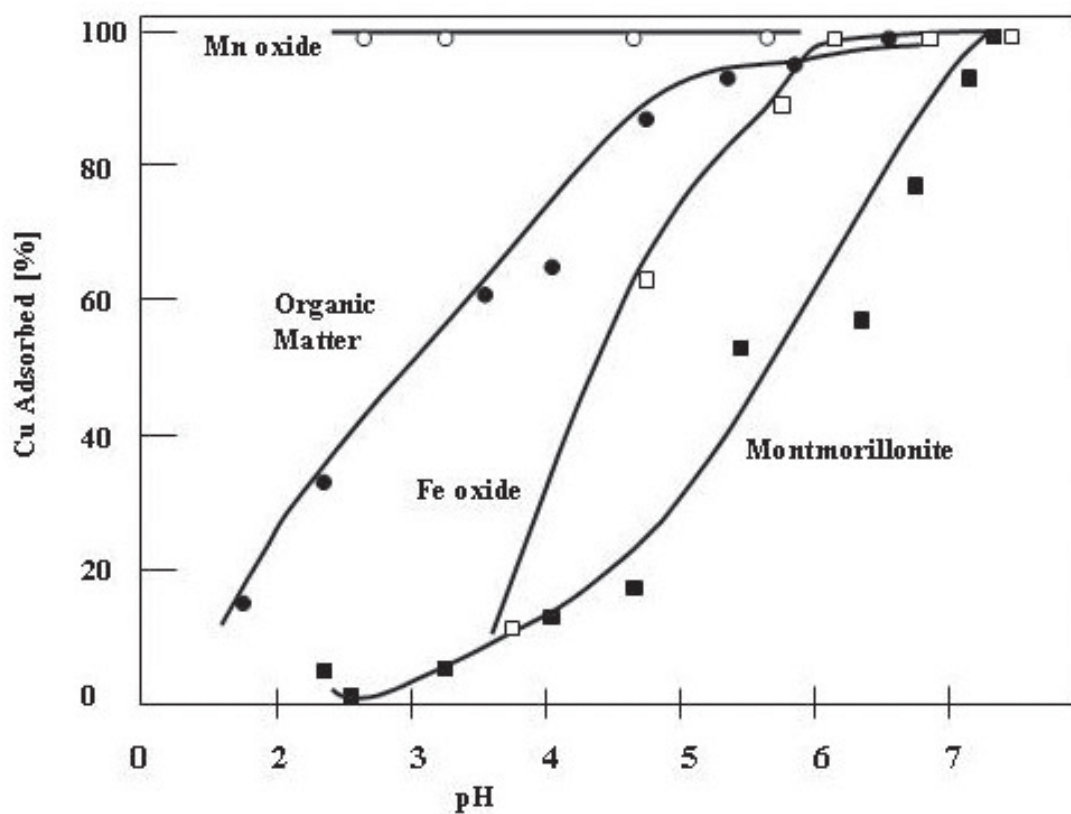


FIGURA 5. Adsorción de Cu en los constituyentes de suelo (Adriano, 2001).

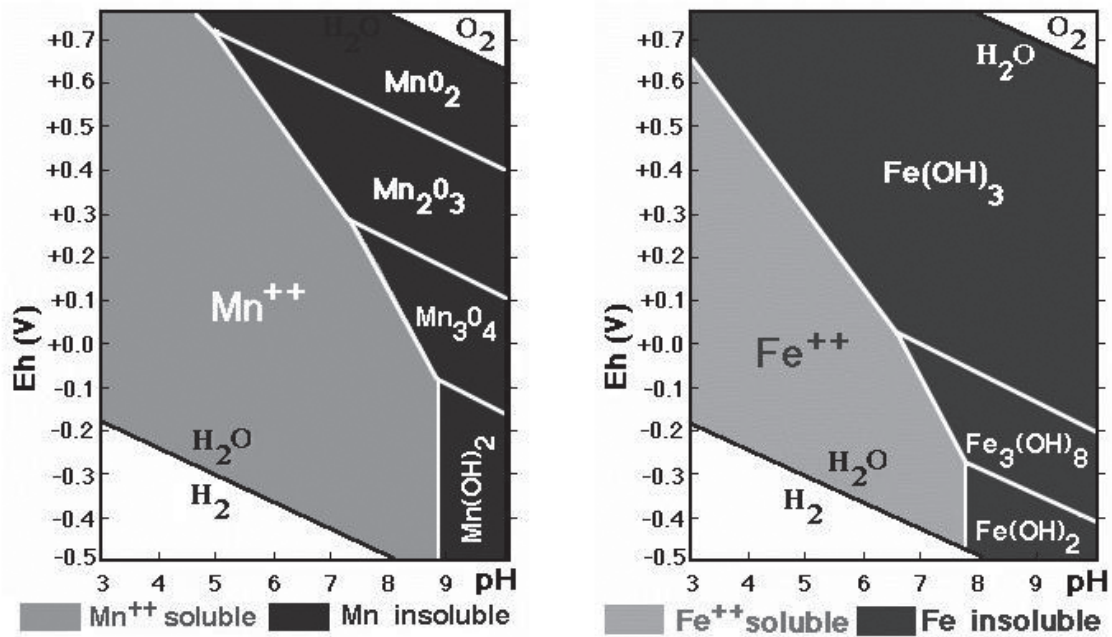


FIGURA 6. Especies químicas de Fe y Mn, presentes en el suelo, en función del pH y de las condiciones de oxidación-reducción.

des de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , el suelo se acidifica fuertemente y los metales se hacen muy solubles.

La estabilidad de los compuestos metálicos se puede visualizar a través de los diagramas Eh-pH (Figura 6) para predecir el comportamiento de los ET frente a un cambio en las condiciones ambientales. Plant y Raiswell (1983) han elaborado una tabla sobre la movilidad de los metales pesados y elementos asociados en función de las condiciones de pH y Eh (Tabla 5).

La textura viene definida por la proporción de partículas de diferentes tamaños que lo constituyen: arena (2-0,05 mm), limo (0,05-0,002 mm) y arcilla (< 0,002 mm). Los suelos con un porcentaje elevado de arena suelen ser incapaces de almacenar agua suficiente como para permitir el buen crecimiento de las plantas y

pierden grandes cantidades de nutrientes por lixiviación. Los suelos que contienen una proporción mayor de arcillas y limo son poco permeables, son depósitos excelentes de agua y retienen minerales que pueden ser utilizados por las plantas. Sin embargo, los suelos muy arcillosos tienden a contener un exceso de agua que da lugar a una consistencia plástica que los hace difíciles de cultivar y que impide, con frecuencia, una aireación suficiente para el crecimiento normal de las raíces.

La estructura del suelo, que define el estado de agregación de los componentes minerales y orgánicos, está relacionada estrechamente con la textura y por consiguiente con el abastecimiento de nutrientes para las plantas. Algunas partículas, las más pequeñas, se comportan como coloides y las cargas negativas se

TABLA 5

Movilidad relativa de los metales pesados según el Eh y pH del suelo

Movilidad	Potencial redox		pH	
	Oxidante	Reductor	Ácido	Neutro/alcalino
Alta	Zn		Zn, Cu, Co, Ni, Hg, Ag, Au	
Media	Cu, Co, Ni, Hg, Ag, Au, Cd		Cd	
Baja	Pb		Pb	
Muy baja	Fe, Mn, Al, Sn, Pt, Cr, Zr	Zn, Cu, Co, Ni, Hg, Au, Cd, Pb, Ag	Al, Sn, Pt, Cr	Al, Sn, Cr, Zn, Cu, Co, Ni, Hg, Ag, Au

repelen quedando en forma dispersa; el resto de las partículas arcillosas no están de forma individual sino que se asocian formando grupos de mayor tamaño (agregados). La materia orgánica, los iones metálicos y complejos organometálicos, así como ciertos compuestos segregados de organismos vivos, actúan como agentes en la formación y estabilización de los agregados. Por ejemplo, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a soluciones coloidales de arcilla neutraliza las cargas de los coloides y favorece la formación de agregados más grandes. Por otro lado, la estructura también tiene importancia en el desarrollo físico de las plantas, el espacio poroso resultante, va a determinar los flujos de agua, oxígeno y nutrientes que facilitan el crecimiento de las raíces.

La porosidad del suelo condiciona el desarrollo de los sistemas radiculares ya que las raíces toman el agua de los poros capilares. Las dimensiones de los poros también son importantes, existiendo poros de dimensiones capilares, donde el agua no circula, siendo mayor la posibilidad de adherencia que la de percolación; y poros no capilares, que facilitan el drenaje y la aireación.

### Disponibilidad de elementos traza en los suelos en los que se desarrollan las plantas $\text{C}_4$ y CAM

Las plantas  $\text{C}_4$  y CAM se desarrollan fundamentalmente en suelos de zonas áridas y semiáridas. En este caso, la casuística expuesta arriba se vería reducida ya que en general los suelos áridos y semiáridos poseen unas características peculiares que resumimos a continuación:

1. Son suelos generalmente pobres en materia orgánica.
2. En los medios semiáridos la meteorización de las rocas está bastante restringida, por lo que los productos de neoformación típicos de la meteorización, que son los minerales neoformados de la fracción arcilla y los sesquióxidos de alúmina y hierro, son escasos. Es decir, en principio estos suelos deberían ser relativamente pobres en arcilla y la composición de ésta es fundamentalmente esmectítica. Sin embargo, esto no se puede tomar al pie de la letra ya que en un paisaje de suelos, a veces abundan los que se formaron en épocas pasadas con condiciones climáticas muy diferentes de las actuales. Podemos bajar a detalles y decir que en concreto en las zonas del Sudeste español, son abun-

dantes los relictos de suelos rojos (rhodoxeralf, palexeralf, etc) que representan estadios muy desarrollados de meteorización de los materiales originarios y que, por lo tanto, pueden ser muy arcillosos y tener una componente caolínica importante en la fracción arcilla. El color rojo ya nos informa además de la abundancia de formas de fases amorfas o pobremente cristalinas de los oxihidróxidos de Fe repartidas como recubrimientos en prácticamente todas las fracciones granulométricas, pero sobre todo en las finas (limo y arcilla). De todas formas las propiedades fisicoquímicas de estos suelos sí reflejan normalmente las condiciones climáticas actuales. Esto quiere decir que aunque en el pasado pudieran ser muy lixiviados y mal drenados o incluso ácidos, actualmente están recarbonatados y sus pH son normalmente neutros o alcalinos.

3. Las condiciones fisicoquímicas de las zonas semiáridas, salvo excepciones, implican suelos con pH de neutro a alcalino (7-8,5) y excepcionalmente muy alcalinos, en el caso de suelos sódicos ( $\text{pH} > 9$ ).

4. Los suelos antiguos muestran huellas relictas de hidromorfia, pero incluso en estos casos las condiciones del suelo no son reductoras sino oxidantes.

5. Los suelos salinos son frecuentes, lo que incrementa la sequedad fisiológica de los suelos al añadirse el potencial osmótico de las sales al potencial capilar de la fase sólida. Además, la abundancia de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{OH}^-$  en estos suelos promueve la formación de complejos de ET que pueden modificar su disponibilidad y movilidad.

6. Tanto en suelos áridos como semiáridos es frecuente el proceso de translocación y precipitación de carbonatos. Un rasgo común de los suelos de estas áreas es su abundancia en carbonato cálcico, que puede llegar incluso al 75% en algunos suelos de cultivo (tierras albarizas) y que, en promedio, es del 30%. (Catálogo de suelos de Andalucía, <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/>). La oclusión de ET en los carbonatos debe de ser un fenómeno frecuente, lo que evidentemente disminuye la disponibilidad, al menos temporalmente, ya que la redisolución de carbonatos durante periodos más húmedos, estacionales o cíclicos, también se puede producir con cierta frecuencia, lo que implicaría la liberación de formas ocluidas de ET.

Teniendo en cuenta el panorama expuesto y las condiciones generales que rigen la disponibilidad, sería previsible el siguiente orden de solubilidad de los ET traza esenciales:  $\text{Mn} > \text{Fe} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mo} > \text{B}$ . De acuerdo a esta secuencia, el Mn no presentaría problemas de

deficiencia para las plantas, mientras que la planta presentaría deficiencias de B. Del resto de los elementos traza no se puede dar una pauta de comportamiento ya que los datos concretos sobre el estatus de ET en suelos de zonas áridas y semiáridas son escasos. Lo que está claro es que, en cualquier caso, el contenido total de ET en los suelos es una guía pobre de su disponibilidad. Los esquemas de extracción secuencial actualmente al uso pueden dar una idea más precisa de la disponibilidad de ET al identificar cuáles son los estados o fases activas a las que están ligadas estos elementos. Como ejemplo exponemos a continuación los resultados obtenidos en el estudio de dos suelos calcáreos.

### Estimación de la disponibilidad de Cu, Pb y Zn en suelos calcáreos

Se han seleccionado dos suelos calcáreos: uno franco-arenoso y otro franco-arcilloso, de la provincia de Granada. Sus características fisicoquímicas, determinadas mediante los métodos analíticos implantados en nuestro laboratorio, se muestran en la Tabla 6. En cuanto a los ET, se han elegido cuatro nutrientes esenciales para las plantas: Cu, Fe, Mn y Zn.

#### Características fisicoquímicas de los suelos

Son suelos pobres en materia orgánica (<2%), alto contenido en carbonatos, baja capacidad de cambio, y pH básico. Los carbonatos son componentes mayoritarios en estos suelos y constituyen importantes superficies de adsorción para los ET. Se considera un contenido normal de carbonato cálcico entre 10-20%. Valores > 20% son considerados altos, y el suelo contiene un exceso de carbonato que le proporciona un pH > 7 debido a la presencia de sales alcalinas en la solución del suelo. Estos valores de pH bloquean en formas insolubles ciertos ET esenciales para las plantas, principalmente el Fe. Son suelos con baja salinidad ya que desde el punto de vista agrícola se considera un suelo como salino si su conductividad > 4 dS/m (equivalente a 70 mM en NaCl). Los contenidos en cationes de cambio están dentro de los valores considerados normales desde el punto de vista edafológico. La capacidad de cambio es baja indicando que estos suelos tienen reducida capacidad de almacenamiento de iones de cambio y por consiguiente baja disponibilidad de nutrientes.

TABLA 6

#### Características de los suelos

Características	Suelo A	Suelo B
Arena %	20,3	67,1
Limo %	50,1	28,1
Arcilla %	29,6	4,8
CO %	0,83	1,71
pH (agua)	8,15	8,12
Conductividad dS/m	0,66	0,91
Carbonatos %	49,8	21,4
Fe libre %	0,66	1,4
ClC meq/100 g	15,5	6,4
Na meq/100 g	0,09	0,08
K meq/100 g	0,37	0,15
Ca meq/100 g	34,5	22,7
Mg meq/100 g	4,77	2,8
Suma cationes	39,8	25,7

#### Fraccionamiento de los ET

Desde el punto de vista biológico, el contenido total de ET en el suelo, no proporciona información acerca de su disponibilidad. Así pues, la determinación de la fracción disponible para las plantas se basa en procesos de extracción química de los ET asociados a las fracciones sólidas del suelo que potencialmente pueden liberarse e incorporarse a la solución del suelo. En la búsqueda de un extractante que simule la absorción por las plantas, se han propuestos multitud de estrategias, desde la extracción con un extractante único hasta la extracción con varios reactivos con poder extractor creciente (extracción secuencial). En nuestro caso se ha seleccionado una extracción secuencial asistida por microondas que se describe en la Tabla 7.

De resultados obtenidos en cada una de las etapas de la extracción secuencial (Figura 7) se puede concluir que el Fe está en su totalidad asociado a la fracción residual (95% para el suelo A y un 90% en el suelo B); el Mn, por otro lado, está distribuido entre las fracciones F1(intercambiable+carbonatos), F2 (óxidos) y F4 (silicatos); el 75% del Cu se encuentra fuertemente bloqueado en la fracción residual (silicatos) y el 25% restante se distribuye por igual entre las otras tres fracciones; por último, el 85% del Zn se asocia con los silicatos y el resto se distribuye entre la fracción correspondiente a los carbonatos y óxidos. La fracción ligada a los carbonatos es mayoritaria después de la residual, siendo mayor en el suelo A, que tiene un contenido mayor en carbonatos.

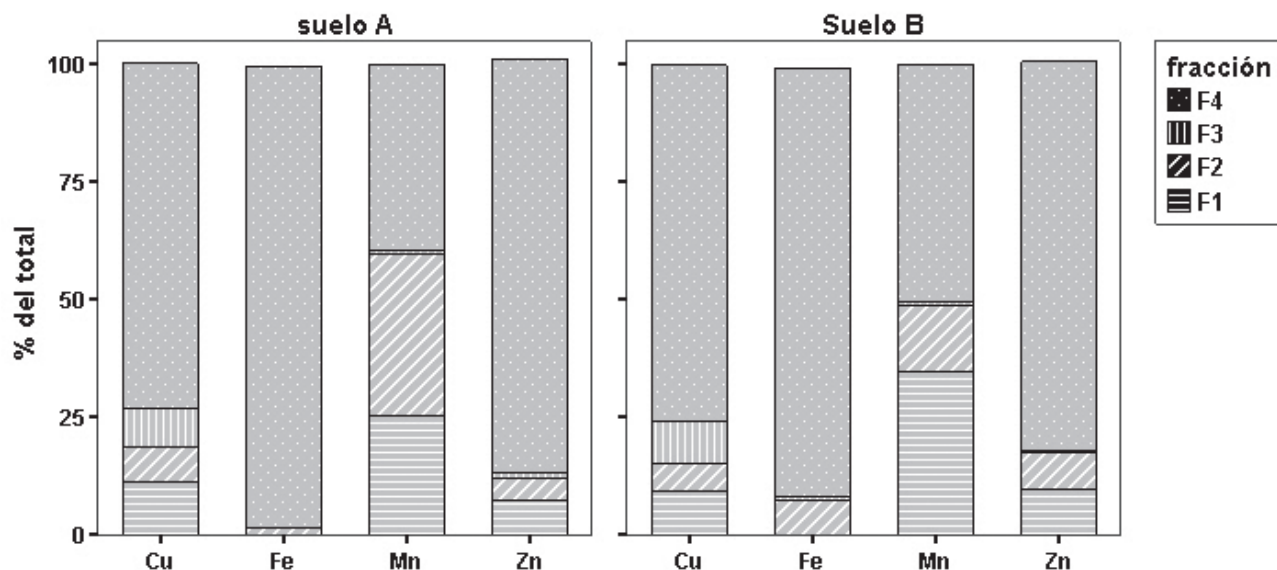


FIGURA 7. Porcentaje de ET extraídos de los suelos, respecto al contenido total, mediante la extracción secuencial (F1: intercambiable+carbonatos; F2: óxidos de Fe y Mn; F3: materia orgánica; F4: residual).

TABLA 7

**Descripción del procedimiento de extracción secuencial utilizada (Campos *et al.*, 1998).**

<i>Etap</i>	<i>Fracción</i>	<i>Extractante</i>
1	Intercambiable + asociada a carbonatos	NaAcO
2	Asociada a los óxidos de Fe y Mn	NH <sub>2</sub> OH.HCl en HAcO
3	Asociada a la materia orgánica	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HNO <sub>3</sub> / NH <sub>4</sub> AcO
4	Residual	HF/HClO <sub>4</sub>

### Extracción simple

Se realiza en una sola etapa utilizando un único extractante que, dependiendo de sus características, extraerá diferentes cantidades de ET que no se puede relacionar con ninguna fracción específicamente. Hemos utilizado dos extractantes clásicos considerados universales: Lakanen y Ervio (1971) que utilizan una solución de NH<sub>4</sub>OAc+HOAc+EDTA y Lindsay y Norvell (1978) que proponen el uso de DTPA+trietanolamina+ CaCl<sub>2</sub>. Adicionalmente se ha aplicado el método propuesto por el BCR (European Community Bureau of Referente) que utiliza EDTA a pH 7 (López Sánchez *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Su comparación con los obtenidos en la extracción secuencial nos permite

evaluar qué contribución tienen las diferentes fracciones del suelo en los contenidos extraídos en las extracciones simples. El Fe no es extraído de forma significativa por ninguno de ellos por lo cual se considera que solamente un porcentaje, muy bajo, del total está disponible. La solución de EDTA extrae Cu y Zn de las fracciones F1+F2 (óxidos+ carbonatos) y Mn únicamente de la F1 (muy disponibles) pero en un porcentaje muy bajo. El extractante Lk extrae menos Cu y Zn que los otros dos pero mucho más Mn y siempre de la F1 solamente. El extractante Ln es el que menos ET extrae y posiblemente sólo sea capaz de extraer los ET intercambiables. Las pautas de los tres extractantes son similares para los dos suelos.

Desde el punto de vista de la nutrición vegetal, la planta absorbe el ET asociado a las fracciones 1 y 2, que se corresponden con la fracción intercambiable, la unida a los carbonatos y la unida a los óxidos de Fe y Mn. Por tanto, el suelo B tiene más potencial de disponibilidad de Cu, Fe, Mn y Zn estimados, tanto a través de la extracción secuencial como a través de los extractantes simples. El orden de disponibilidad de los ET en ambos suelos es Mn>Cu>Zn>Fe. El porcentaje de cada uno de los ET unido a la materia orgánica no es apreciable debido al bajo contenido de MO de ambos suelos, excepto para Cu. Por otro lado, la CIC y contenido en arcilla, más bajo en el suelo A, junto con mayor contenido en MO, sugiere una menor disponibilidad de nutrientes que el suelo B. En cambio, los resultados indican lo contrario, por lo que los carbona-

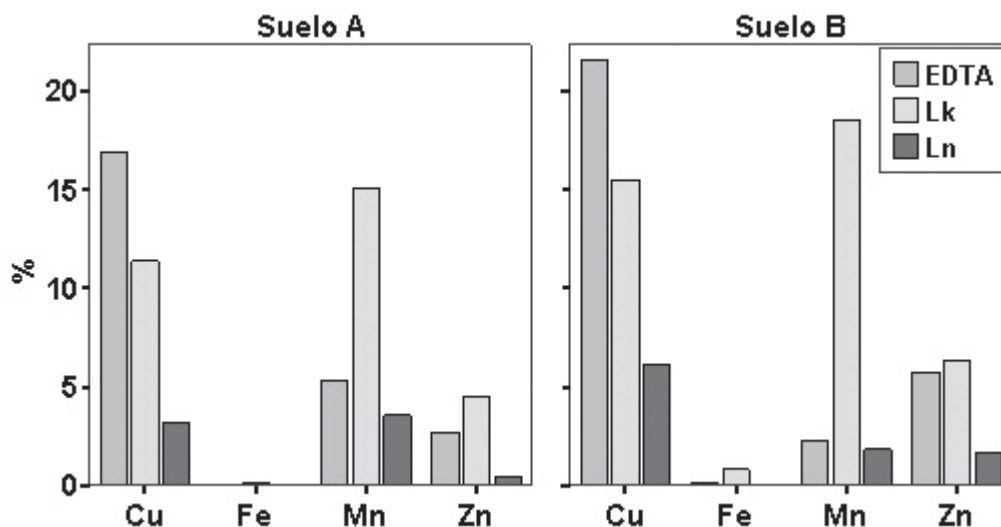


FIGURA 8. Porcentaje de ET extraídos de los suelos, respecto al contenido total, mediante el extractante propuesto por Lakanen y Ervio (Lk), Lindsay y Norvell (Ln) y por el del BCR (EDTA).

tos, más altos en suelo A, son los causantes de la retención de estos ET.

Concluyendo, los resultados obtenidos en el fraccionamiento concuerdan con los principios teóricos expuestos más arriba. Sin embargo hay aspectos de difícil comprensión que ponen de manifiesto que hace falta realizar mucho más trabajo experimental para alcanzar un conocimiento más preciso de la dinámica de ET en estos suelos y su relación con la el desarrollo de plantas C<sub>4</sub> y CAM.

## Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. E. Barahona por sus consejos en la elaboración de este capítulo.

## Referencias bibliográficas

- ADRIANO, D.C., 2001. *Trace Elements in Terrestrial Environments*, Springer-Verlag, New York (USA).
- ALLOWAY, B.J., 1995. *Heavy Metals in Soils*, Blackie, Glasgow (UK).
- BASTA, N.T.; RYAN, J.A. y CHANEY, R.L., 2005. «Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil, Key Concepts and Metal Bioavailability». *J. Environ. Qual.* 34: 49-63.
- RADY, N.C. y WEIL, R.R., 2002. *The nature and properties of soils*. Prentice Hall, 960 pp, New Jersey (USA).
- CAMPOS, E.; BARAHONA, E.; LACHICA, M. y MINGORANCE, M.D., 1998. «A study of the analytical parameters important for the sequential extraction procedure using microwave

- heating for Pb, Zn and Cu in calcareous soils». *Anal. Chim. Acta* 44, 181-191.
- ISKANDAR, Y.K. y KIRHAM, M.B., 2001. *Trace elements in soil. Bioavailability, flux and transfer*, CRC Press LLC, 287 pp, Florida (USA)
- KABATA-PENDIAS, A., 2000. *Trace elements in soils and plants*. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, 432 pp. Boca Raton, FL.(USA)
- LASSAT, M., 2001. *The use of plants for removal of toxic metals from soils*. US-EPA.
- LAKANEN, E. y ERVIO, R., 1971. «A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils». *Acta Agr. Fenn.* 123, 223-232.
- LINDSAY, W.L. y NORVELL, W.A., 1978. «Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper». *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 42, 421-428.
- LÓPEZ SÁNCHEZ, J.F.; SAUQUILLO, A.; RAURET, G.; LACHICA, M.; BARAHONA, E.; GÓMEZ, A.; URE, A.M.; MUNTAU, H. y QUEVAUVILLER, P.H., 2002. «Extraction procedures for soil analysis». En: *Methodologies for soil and sediment fractionation studies. Single and Sequential extraction procedures*. Quevauviller PH, editor. 28-57. The Royal Society of Cambridge, Cambridge, UK.
- MARKERT, B., 1994. «The biological system of the elements (BSE) for terrestrial plants (glycophytes)». *Sci Total Environ* 155, 221-228.
- MCBRIDE, M.B., 1997. *Environmental chemistry of soils*. Oxford Univ. Press. 416 pp. USA.
- PLANT, J.A. y R. RAISWELL, R., 1983. «Principles of environmental geochemistry», p. 1-39. In I. Thornton (ed.) *App. Environ. Geochem.* Academic Press, London (UK).
- RUSSELL, E.W., 1973. *Soil conditions and plant growth*, Longman Inc., 849 pp, NY (USA).
- TAIZ, L. y ZEIGER, E., 1998. *Plant Physiology*, 2<sup>nd</sup> ed., Sinauer Associates, Inc, Publishers.
- VANGRONSVELD, J. y CUNNINGHAM, S.D., 1998. *Metal-Contaminated soils: In-situ inactivation and phytoremediation*. 200 pp. Springer-Verlag, Berlin (Germany).

# El recurso suelo-agua en medios áridos y semiáridos

JESÚS FERNÁNDEZ GÁLVEZ\*

## Resumen

El suelo y el agua representan recursos de incuestionable importancia, por lo que han sido y son objeto de estudio en multitud de disciplinas y, con frecuencia, suelen aparecer unidos bajo un mismo nombre, suelo-agua. Sin embargo, resulta paradójico que exista menos información de este recurso en regiones áridas y semiáridas, representando éstas el mayor porcentaje de superficie emergida y donde su entorno es aún más crítico.

El recurso suelo-agua en regiones áridas y semiáridas se caracteriza por su elevada heterogeneidad, con complejas interacciones tanto internas como en la interfase con otros compartimentos ambientales, y donde los procesos tienen lugar en escalas de tiempo bastante lentas, salvo en ocasiones puntuales, donde las precipitaciones aceleran los acontecimientos. Este capítulo presenta las características principales del recurso suelo-agua y sus interacciones en el contexto donde se desarrollan la mayor parte de las plantas  $C_4$  y CAM.

## Summary

Soil and water represent resources of unquestionable importance. For this reason they have been and are subject of study in multitude of disciplines and moreover they frequently appear linked under the same name, soil-water. Nevertheless, it is paradoxical the greater lack of information of this resource in arid and semiarid regions, being these areas the greatest percentage of emerged land and where their environment all conditions are even more critical.

The soil-water resource in arid and semiarid regions is characterized by high heterogeneity, with complex internal interactions as well as at the interface with other environmental compartments and with processes taken place at very low time scale; except occasionally, when rainfall accelerates happening. This chapter presents the main characteristics of the resource soil-water and its interactions within the context in which the majority of  $C_4$  and CAM plant develop.

## Introducción

El suelo constituye la interfase entre la superficie terrestre emergida y la atmósfera, siendo extraordinariamente importante, desde un punto de vista medioambiental, no sólo por ser el medio sobre el que se desarrolla gran parte de la vida en nuestro planeta, sino también, por ser la responsable del reparto del agua en el ciclo hidrológico. Los intercambios de agua, energía y momentos en la superficie terrestre son fenómenos que condicionan fuertemente el clima y, precisamente, el agua del suelo es la principal responsable del reparto en la interfase suelo-atmósfera. Las condiciones de la superficie del suelo controlan la precipitación que se infiltra y la fracción desplazada por escorrentía, además de la partición de radiación entre calor sensible y latente. La actividad microbiológica del suelo, la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas dependen también, fundamentalmente, del contenido en agua del suelo.

Las zonas áridas y semiáridas ocupan en la actualidad más del 47% de la superficie emergida del planeta (UNEP, 1997), y están geográficamente distribuidas por todos los continentes; ahora bien, casi la mitad de los países del mundo están, de alguna forma, directamente afectados por problemas de aridez. África es el continente con mayor extensión de zonas áridas, mientras que Australia, con un 75% de su área, posee la mayor parte de su superficie bajo este tipo de ambientes (Gratzfeld, 2003).

A pesar de su importancia, hasta el presente la hidrología de zonas áridas y semiáridas no ha recibido tanta atención como la de otras regiones climáticas (Scanlon *et al.*, 1997). Sin embargo, más recientemente se está haciendo un gran esfuerzo para entender la variabilidad en los flujos y procesos que ocurren en este tipo de ambientes (Nash, 1999) con ambiciosos experi-

\* Departamento Geoquímica Ambiental. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1, 18008-Granada, España.

mentos a gran y mediana escala (Desconnets *et al.*, 1997; Abu-Awwad y Shatanawi, 1997; Cattle, 1999), o desarrollando modelos que permiten explicar su comportamiento (Gore *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1999).

### Características ambientales de zonas áridas y semiáridas

El principal factor limitante en zonas de clima árido y semiárido es la disponibilidad de agua. La cantidad y disponibilidad estacional del agua son primordiales para la supervivencia a largo plazo y para la distribución de las plantas. Tradicionalmente, la clasificación de zonas áridas, semiáridas y húmedas se basaba sólo en la precipitación anual media (Lloyd, 1986). En la actualidad, esta clasificación se realiza en base a la relación entre la precipitación y la evaporación. Las zonas áridas y semiáridas se caracterizan por tener una *ratio* de precipitación media anual y evapotranspiración potencial inferior a 0,65 (UNEP, 1997). Esto indica una enorme descompensación entre la cantidad de agua que potencialmente puede pasar a la atmósfera por evapotranspiración y la cantidad de agua de lluvia que realmente reciben estas zonas. Estas regiones presentan una demanda evaporativa atmosférica elevada que depende fundamentalmente de la radiación solar, la presión de vapor del aire y la velocidad del viento; por ello, en la mayoría de los casos, la evapotranspiración está limitada por la disponibilidad de agua en el suelo frente a la demanda atmosférica. Por lo demás, el régimen de precipitaciones se caracteriza por una alta irregularidad tanto espacial como temporal, agravando aún más la problemática, en ocasiones, con tormentas de alta intensidad que descargan la mayor parte de la lluvia anual en un breve periodo de tiempo. Durante la mayor parte del tiempo, las bajas precipitaciones y las altas tasas de evapotranspiración dan lugar a flujos de agua de pequeña magnitud pero de una gran importancia para el comportamiento del sistema.

Hay también otras características ambientales propias de este tipo de zonas, como son: altos niveles de radiación solar incidente, variaciones amplias de temperatura durante el día y la noche, fuertes vientos, altas tasas de arrastre de sedimentos, así como importantes pérdidas de agua por infiltración en canales aluviales.

Las diferencias fundamentales entre el comportamiento hidrológico de zonas áridas y húmedas limita

el uso de las técnicas desarrolladas para estas últimas. Estas diferencias incluyen el espesor de la zona no saturada, que puede llegar a ser de varios cientos de metros en regiones áridas frente a los pocos metros de espesor comúnmente encontrados en zonas húmedas. Los flujos de agua y los contenidos en agua de la zona no saturada también tienen un mayor rango de variación en los ambientes áridos y semiáridos. El mayor espesor de la zona no saturada y los menores flujos de agua comunes de zonas áridas dan lugar a procesos en una escala de tiempo mucho mayor (Scanlon *et al.*, 1997). Por todo ello, los resultados de zonas húmedas no son directamente aplicables a regiones más áridas. Además, los flujos de agua objeto de estudio tienen una magnitud cercana al error inherente en la medida, lo que dificulta la resolución de aspectos básicos, tales como la dirección y la velocidad del flujo de agua en la zona no saturada. Aunque, en la actualidad, se ha conseguido una mejora significativa en la medida de la mayor parte de los componentes del balance de agua y energía en el suelo (Albertson *et al.*, 1995), existen componentes de estos balances que intrínsecamente presentan errores de medida importantes (del orden del 5% para la precipitación y del 10% para la evaporación). Por otro lado, la elevada variabilidad espacial requiere información detallada a pequeña escala que no siempre es extrapolable y con una resolución temporal muy variable, donde los mayores flujos tienen lugar como consecuencia de la respuesta a los escasos eventos de precipitación. La mayor parte del flujo no saturado en regiones áridas se centra bajo depresiones topográficas, siendo el flujo difuso muy limitado. El mayor espesor de la zona no saturada junto a la lentitud de los flujos de agua en ésta tienen como resultado la conservación de las variaciones paleoclimáticas en el flujo de agua, y sugieren una posible falta de equilibrio entre la zona no saturada profunda y el clima actual. Si bien es cierto que, en algunos casos, existe una conexión a través del flujo preferencial que fundamentalmente es producida en la zona radicular y por fracturas de rocas.

### Características edáficas de zonas áridas y semiáridas

Los suelos de zonas áridas y semiáridas pueden tener una profundidad muy variable, con texturas

desde arenosas hasta arcillosas y con pH y fertilidad variable. En estas zonas es frecuente la presencia de suelos con perfiles incipientes o poco desarrollados. Los suelos de este tipo se caracterizan por acumulación de sales solubles en el perfil, aunque la profundidad, distribución, cantidad y tipo de sales acumuladas están condicionadas por la composición del agua que alcanza el perfil y los flujos que se producen dentro del mismo. Para suelos con un mismo grado de desarrollo, la profundidad a la que se encuentra la máxima acumulación de sales está directamente relacionada con los flujos de agua descendentes. También la geomorfología de muchas zonas áridas crea grandes cuencas de drenaje interiores sin salida natural. La evaporación del agua en zonas sin drenaje deja en el suelo sales que en caso de no ser disueltas por la lluvia y redistribuidas ocasionan problemas de salinización.

Otra característica importante de los suelos de zonas áridas y semiáridas es la presencia de un horizonte cálcico formado por acumulación de carbonato que, en algunos casos, puede llegar a formar una costra de muy baja permeabilidad. La tasa de infiltración de estos horizontes cálcicos suele estar inversamente relacionada con el contenido en carbonato de estos horizontes (Gile, 1961). De forma general, la productividad de estos suelos depende fuertemente de su capacidad de retención de agua, que tiende a aumentar con la profundidad y el contenido en materia orgánica. También los suelos arenosos presentan una menor capacidad de retención de agua frente a los arcillosos. La textura de la capa más superficial del suelo condiciona fuertemente el movimiento del agua en la zona no saturada. Las texturas finas favorecen el almacenamiento de agua y la retienen infiltrada cerca de la superficie, aumentando así la conductividad hidráulica y la disponibilidad para la evapotranspiración. Texturas más gruesas favorecen la penetración del agua hacia zonas profundas, llegando a alcanzar profundidades por debajo de la zona radicular pero, cuando el contenido en agua descende, la conductividad hidráulica disminuye bruscamente, dificultando el flujo ascendente de agua. La heterogeneidad y la horizonación del suelo son también factores que condicionan el movimiento del agua. La heterogeneidad textural está presente a pequeña y gran escala, pero esta heterogeneidad local puede no ser muy importante en suelos de zonas áridas y semiáridas donde gran parte del agua es adsorbida por la superficie de las partículas sólidas y donde gran parte del flujo de agua ocurre en forma de vapor. La horizo-

nación, a su vez, reduce los flujos de agua en la zona no saturada y más aún cuando capas de material grueso se intercalan con capas de material fino. En este último caso, el flujo de agua se ve interrumpido hasta que la capa de material fino alcanza contenidos en agua próximos a saturación, permaneciendo el agua colgada por encima de la capa de material más grueso (Fernández Gálvez *et al.*, 2005).

El contenido en materia orgánica y la estabilidad de los agregados del suelo disminuyen generalmente con la aridez. Como consecuencia, las tasas de infiltración también disminuyen, aumentando la fracción de escorrentía superficial. En regiones de extrema aridez la cobertura vegetal se reduce a pequeñas zonas dispersas y, en la mayor parte de la superficie del suelo, la materia orgánica es prácticamente inexistente. La superficie del suelo es el primer punto de contacto de la lluvia, y las propiedades físicas y químicas del material superficial desempeñan un papel primordial en la generación de escorrentía. Con el aumento en aridez también aumenta la presencia de rocas en superficie. Además, las costras biológicas superficiales pueden reducir significativamente las tasas de infiltración (Yair, 1990; Solé-Benet *et al.*, 1997) y, en ocasiones, se comportan como superficies hidrófobas acentuando la escorrentía.

Como se ha dicho anteriormente, la frecuentemente escasa vegetación en este tipo de zonas hace que el suelo sea más vulnerable a los impactos por gotas de lluvia, lo que propicia a su vez el arrastre de partículas en el espacio poroso del suelo, convirtiéndolo así en más denso, con una mayor dureza y una menor capacidad de absorción. Este efecto se conoce como «sellado del suelo» y agrava aún más la problemática de conservación de agua del suelo en las zonas áridas y semiáridas. Durante eventos de precipitación de alta intensidad las gotas de lluvia dispersan la matriz del suelo y forman una superficie estable de menor permeabilidad. La mayor parte de la escorrentía en suelos de textura fina en regiones áridas y semiáridas es debida a este encostramiento (Lange y Leibundgut, 2003). El sellado de la superficie del suelo, además de favorecer la escorrentía superficial, incrementa la erosión y la pérdida de material fino y de nutrientes. Una vez erosionado, el suelo queda menos útil para soportar vegetación y es más susceptible a futuras alteraciones por el agua y el viento. Esta degradación presenta, por tanto, efectos de retroalimentación que pueden incluso dar lugar a la pérdida del recurso suelo.

## El agua en la zona no saturada

El contenido en agua del suelo desempeña un papel relevante, como ya se ha indicado, y, más aún, cuando la disponibilidad de agua es escasa. Algunos estudios reflejan su importancia, incluso en las precipitaciones locales. Fennessey y Sud (1983) sugieren que sequías a gran escala durante periodos prolongados pueden estar originadas por mecanismos de retroalimentación entre el contenido en agua del suelo y la precipitación. En general, estos fenómenos son no lineales, y estas interrelaciones dependen, además, de la escala espacial considerada, aumentando la intensidad de las mismas con el aumento de escala. Por ejemplo, para el caso de una superficie de suelo a una escala espacial pequeña ( $<10^4$  m), la evapotranspiración desde la superficie del suelo a la atmósfera no modifica significativamente el contenido en agua precipitable en la atmósfera. Por tanto, la precipitación es una constante en procesos hidrológicos a pequeña escala. Por el contrario, a escalas mayores ( $>10^4$  m) el contenido en agua de la atmósfera sí que está afectado por la evapotranspiración, por lo que no puede considerarse como una constante (Kim, 1995). Así pues, inferir el comportamiento hídrico a gran escala a partir del conocimiento de los fenómenos a pequeña escala es bastante complicado. Además, la heterogeneidad del suelo en estas zonas, así como la de la atmósfera, complican aún más el estudio de estos sistemas a gran escala. También es importante destacar que los suelos de regiones áridas y semiáridas muestran poca conectividad hidrológica, lo que aumenta la heterogeneidad espacial en la distribución del agua dentro, incluso, de cuencas o zonas donde la topografía podría indicar una mayor conectividad (Puigdefabregas *et al.*, 1998). La transferencia de agua de unas zonas a otras suele ser bastante lenta, pues ocurre fundamentalmente por medio de flujo no saturado y sólo en ocasiones por flujos superficiales.

En la actualidad existe un buen número de dispositivos para determinar el contenido en agua del suelo basados en técnicas muy diferentes. De forma general, estas técnicas pueden agruparse en cinco grupos: gravimétricas, tensiométricas, atenuación de neutrones, disipación de calor y técnicas dieléctricas. La medición directa del contenido en agua del suelo se realiza mediante pesada y secado de un volumen de suelo conocido, pero este tipo de determinaciones, además de laboriosa, es destructiva y, por tanto, no

adecuada en muchos casos. Al ser la única medida directa, aunque no exenta de errores (Gardner, 1986), es la metodología de referencia y base para la calibración del resto de técnicas. Otras técnicas se basan en medidas indirectas de propiedades del suelo que varían a su vez con el contenido en agua (Fernández Gálvez, 2003). Ahora, algunas de estas nuevas técnicas están siendo ampliamente utilizadas en regiones áridas y semiáridas (Cantón *et al.*, 2004), alcanzando un nivel de automatización elevado, lo que permite disponer de información detallada imprescindible para entender el comportamiento del agua en este tipo de zonas.

A gran escala también existe la posibilidad de determinar el contenido en agua por medio de teledetección, con sensores aerotransportados o desde satélites. La radiación emitida y reflejada por la superficie terrestre está directamente relacionada con el contenido en agua de la capa más superficial del suelo y de ahí la posibilidad de obtener estimaciones globales a escalas del orden de  $\text{km}^2$  y con una resolución temporal elevada. Los suelos de las regiones áridas y semiáridas, debido a su gran extensión ya mencionada, tienen cada vez mayor representatividad en la información disponible desde satélite, lo que aumenta aún más la necesidad de conocimiento sobre este tipo de suelos. Actualmente hay iniciativas desarrollando sensores basados en teledetección por medio de microondas pasivas para la determinación remota del contenido en agua del suelo (SMOS, HYDROS). Este tipo de técnicas también se basan en las variaciones de las propiedades dieléctricas de la superficie del suelo con su contenido en agua (Jackson, 1993). En este caso, las limitaciones son: la escasa profundidad de suelo muestreada y la baja resolución espacial, lo que imposibilita por sí mismo la estimación de flujos de agua a pequeña escala. Aunque la variabilidad espacial impide la determinación de flujos de agua en sistemas heterogéneos, las variaciones temporales del contenido en agua sí que pueden utilizarse para evaluar el movimiento del agua en la zona no saturada. Una vez más, las incertidumbres asociadas a la calibración de los instrumentos pueden estar muy cercanas a la magnitud de los flujos. La combinación de esta información remota en superficie junto con modelos capaces de describir las interacciones entre la atmósfera y el suelo, deben proporcionar un conocimiento del comportamiento global del agua en estos ecosistemas.

## Flujos de agua en el suelo en zonas áridas y semiáridas

Generalmente, la dirección de los flujos de agua en el suelo resulta bastante compleja en regiones áridas y semiáridas, debido a la gran variedad de procesos que pueden dar lugar al movimiento de las moléculas de agua. Además, la variabilidad en los regímenes de precipitación de las zonas áridas causa también variabilidad en los flujos de agua en la zona no saturada. Gradientes de potencial mátrico, gravitacional y osmótico, así como de temperatura y presión, son responsables, en ocasiones con igual magnitud pero con direcciones contrapuestas, de la dirección final del flujo de agua. Debido a la elevada heterogeneidad, estos flujos presentan cambios de dirección que varían espacial y temporalmente. El flujo de agua se produce tanto en forma líquida como en vapor de agua, siendo en las zonas áridas y semiáridas donde el flujo de vapor de agua alcanza valores significativos que llegan, incluso, en algunos casos a valores superiores al flujo de agua líquida. Ambos flujos de agua están dirigidos por los gradientes de potencial hidráulico, vapor de agua y temperatura, lo que en definitiva condiciona la dirección final del flujo neto de agua en una determinada zona. La conductividad hidráulica saturada, la conductividad isotérmica del vapor de agua, la difusividad térmica del vapor de agua y el coeficiente de transporte para flujo líquido debido a gradientes de temperatura, determinan las características del flujo neto para los gradientes anteriormente mencionados.

La conductividad isotérmica del vapor de agua es aproximadamente constante para un amplio rango de valores de contenido en agua del suelo, mientras que la conductividad hidráulica varía órdenes de magnitud dentro de ese mismo rango. Ambas sólo llegan a ser comparables para contenidos en agua del suelo relativamente bajos. Ello es debido a que la conductividad del vapor de agua depende de la humedad relativa del suelo, que es aproximadamente constante y no cambia en más de un orden de magnitud para diferentes tipos de suelo. Por el contrario, la conductividad hidráulica del suelo está fuertemente influenciada por el contenido en agua del mismo y presenta mayores diferencias entre distintos tipos de suelo. Aunque los flujos isotérmicos de vapor y agua líquida están dirigidos exclusivamente por los gradientes de presión de agua, también presentan una dependencia indirecta con la temperatura puesto que ésta influye en la presión de vapor de

agua y la conductividad hidráulica del vapor y el agua líquida.

En zonas áridas y semiáridas, el flujo de agua líquida debido a gradientes de temperatura es despreciable comparado con el flujo térmico de vapor de agua. Este último es debido a variaciones en la presión de vapor con la temperatura y, generalmente, se considera mucho más importante que el flujo de vapor isotérmico, puesto que los gradientes de vapor debidos a gradientes de presión del agua son menores en comparación con los debidos a gradientes de temperatura. Variaciones estacionales de la temperatura del suelo con la profundidad dan lugar a gradientes de temperatura descendentes durante el verano y ascendentes durante el invierno (Scanlon, 1994). Como el vapor de agua se mueve desde las zonas de mayor a menor temperatura, los flujos de vapor resultantes son descendentes durante el verano y ascendentes durante el invierno. Además, debido al aumento de la difusividad térmica del vapor de agua con la temperatura, los flujos de vapor de agua descendentes durante el verano son mayores que los ascendentes durante el invierno.

En la mayoría de los casos, los suelos de ambientes áridos se encuentran a niveles de contenido en agua bastante bajos y es por ello que el movimiento del agua se vuelve más complejo, debido a la combinación de procesos de transporte que tienen lugar tanto en forma líquida como gaseosa, donde la importancia relativa de cada uno de estos procesos varía de un suelo a otro. Es importante señalar que el movimiento del vapor de agua no permite el transporte de iones, siendo esta discriminación relevante en cuanto al suministro de nutrientes y agua en suelos con contenido en agua próximo al punto de marchitamiento permanente de las plantas, y al posible movimiento de sales en la hidrología agrícola de las regiones áridas y semiáridas (Rose, 1968).

También es frecuente que se produzcan ganancias de agua causadas por condensación en superficie en forma de rocío, por adsorción de vapor de agua y deposición atmosférica por niebla, contribuyendo de forma significativa al balance neto de agua fundamentalmente durante la ausencia de precipitaciones (Jacobs *et al.*, 1999). La deposición en forma de rocío se produce generalmente durante la noche, cuando la temperatura en la superficie del suelo baja por debajo del punto de rocío y se produce la condensación del vapor de agua atmosférico sobre la capa más superficial del suelo (Monteith, 1957). Bajo determinadas condi-

ciones atmosféricas y de la superficie del suelo, el vapor de agua de la atmósfera también puede ser adsorbido por la superficie de las partículas sólidas en la capa más superficial del suelo. La adsorción de vapor de agua también representa un aporte importante en regiones áridas y semiáridas (Kosmas *et al.*, 1998, 2001; Agam y Berliner, 2004, 2006; Verhoef *et al.*, 2006), llegando en algunos casos a representar incluso hasta el 70% de la evaporación diaria (Kosmas *et al.*, 2001). También puede suceder que la concentración de vapor atmosférico alcance su valor de saturación, dando lugar a pequeñas gotas de agua que flotan en la atmósfera formando niebla y que pueden depositarse sobre la superficie del suelo.

Aparte del agua proveniente de lluvias y tormentas, una parte importante de la reserva de agua en los ambientes áridos y semiáridos proviene de las aguas subterráneas. Esta reserva incluye el agua fósil o geológicamente atrapada que, por la carencia de aportes adicionales de lluvia, se convierte en un recurso finito no renovable. La cantidad y naturaleza del agua superficial está determinada en gran medida por la baja y variable precipitación además de la topografía, la permeabilidad del suelo, la cubierta vegetal y la tasa de evaporación.

Las aguas subterráneas se distribuyen de forma irregular y, generalmente, el espesor de la zona no saturada suele ser otra característica distintiva de las zonas áridas y semiáridas (Scanlon *et al.*, 1997). La presencia de un nivel freático muy profundo hace que el flujo no saturado de agua y el vapor de agua discurren en cualquier dirección vertical dependiendo de las condiciones superficiales y, en la mayoría de los casos, evitando que el agua infiltrada pueda percolar hasta zonas profundas en las que se sitúan los acuíferos. Por tanto, la recarga natural de acuíferos en ambientes áridos y semiáridos está condicionada por el flujo vertical descendente de agua en la zona no saturada y por el exceso de disponibilidad de agua por encima de la demanda evapotranspirativa. A su vez, sólo una pequeña parte del agua subterránea entra a formar parte en el ciclo hidrológico y en algunos casos se producen recargas locales; algunos acuíferos constituyen sistemas cerrados sin recarga una vez que son drenados. Generalmente, los sistemas abiertos reciben aportaciones desde zonas con mayor nivel de precipitación, desde ríos, canales o movimiento de aguas subterráneas. Algunos acuíferos profundos están formados por agua fósil, atrapada hace millones de años bajo condiciones climáticas más húmedas.

Es, precisamente, en este tipo de ambientes donde existe una mayor proporción de plantas que presentan mecanismos de optimización del uso del agua. Por ejemplo, las plantas CAM (Metabolismo Ácido de las Crassulaceae) resuelven el problema de la pérdida de agua durante la fotosíntesis al abrir sus estomas exclusivamente durante la noche, cuando la demanda evaporativa es menor debido a una temperatura más baja y una humedad del ambiente relativamente más alta. De esta forma, el mecanismo CAM le permite a la planta maximizar la eficiencia en el uso del agua. Las plantas  $C_4$  también presentan adaptaciones al estrés hídrico, siendo capaces de captar  $CO_2$  con un menor grado de apertura estomática. Típicamente una planta CAM pierde de 50 a 100 g de agua por cada gramo de  $CO_2$  fijado, en el caso de las plantas  $C_4$  estos valores llegan a un consumo de agua de unos 250-300 g mientras que las plantas  $C_3$  pierden del orden de 400 a 500 g de agua por cada gramo de  $CO_2$ . Esta ventaja competitiva en ambientes con poca agua hace que, generalmente, se asocien las plantas CAM y  $C_4$  a climas desérticos (Taiz y Zeiger, 1991). Además, la vegetación en estas zonas suele ser oportunista, aumentando su crecimiento en los periodos en los que hay mayor disponibilidad de agua y disminuyendo su actividad durante los periodos más secos. En suelos desérticos o en aquellos donde el contenido en agua es extremadamente escaso, la vegetación puede llegar a ser la mayor responsable en los flujos de agua en el suelo.

## Referencias bibliográficas

- ABU-AWWAD, A. M. y SHATANAWI, M. R., 1997. «Water harvesting and infiltration in arid areas affected by surface crust: examples from Jordan». *Journal of Arid Environments*, 37, 443-452.
- AGAM, N. y BERLINER, P. R., 2004. «Diurnal water content changes in the bare soil of a coastal desert». *Journal of Hydrometeorology*, 5, 922-933.
- AGAM, N. y BERLINER, P. R., 2006. «Dew formation and water vapour adsorption in semi-arid environments - A review». *Journal of arid environments*, 65, 572-590.
- ALBERTSON, J. D.; PARLANTE, M. B.; KATUL, G. G.; CHU, C. R.; STRICKER, H. y TYLER, S.W., 1995. «Sensible heat flux from arid regions». *Water Resources Research*, 31, 969-974.
- CANTÓN, Y.; SOLÉ-BENET, A. y DOMINGO, F., 2004. «Temporal and spatial patterns of soil moisture in semiarid badlands of SE Spain». *Journal of Hydrology*, 285, 199-214.
- CATTLE, S. R., 1999. «Efficacy of perforating the soil to capture and store rain during fallow in dry regions». *European Journal of Soil Science*, 50, 481-487.
- DESCONNETS, J. C.; TAUPIN, J. D.; LEBEL, T. y LEDUC, C., 1997. «Hydrology of the HAPEX-Sahel Central Super-Site:

- surface water drainage and aquifer recharge through the pool system». *Journal of Hydrology*, 188-189, 155-178.
- FENNESSEY, M. J. y SUD, Y., 1983. *A study of the Influence of Soil Moisture on Future Precipitation. Technical Memorandum 85042*. NASA, Goddard Space Flight Centre, Greenbelt, Maryland (USA).
- FERNÁNDEZ GÁLVEZ, J., 2003. *Dinámica del agua en suelos con gravas*. Monográfica, Biblioteca de Ciencias Experimentales y Exactas. Editorial Universidad de Granada, 190 pp. Granada (España).
- FERNÁNDEZ GÁLVEZ, J.; SIMMONDS, L. P. y BARAHONA, E., 2005. «Interpretation of soil moisture profiles on gravel rich soils derived from soil dielectric measurements». En: *Sustainable Use and Management of Soils -Arid and Semiarid Regions-*, *Advances in GeoEcology* 36, 241-250. Eds. A. Faz Cano, R. Ortiz y A. R. Mermut. Catena Verlag GMBH, Reiskirchen, (Alemania).
- GARDNER, W. H., 1986. «Water content». En: *Methods of soil analysis Part 1. Physical and mineralogical methods*. 2<sup>nd</sup> Edition. *Agronomy* 9 (1), 493-541. Ed. A. Klute. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (USA).
- GIAO, P. H.; PHUEN-WEJ, N. y HONJO, Y., 1999. «FEM quasi-3D modeling of responses to artificial recharge in the Bangkok multiaquifer system». *Environmental Modelling and Software*, 14, 141-151.
- GILE, L. H., 1961. «A classification of horizons in the soil of a desert region, Doña Ana County, New Mexico». *Soil Science Society of America Proceedings*, 25, 52-61.
- GORE, K. P.; PENDKE, M. S.; GURUNADHA, V. V. S.; GUPTA, C. P., 1998. «Groundwater modeling to quantify the effect of water harvesting structures in Wagarwadi watershed, Parbhani district, Maharashtra, India». *Hydrological Processes*, 12, 1043-1052.
- GRATZFELD, J. (Ed.), 2003. *Extractive Industries in Arid and Semi-Arid Zones: Environmental Planning and Management*. IUCN - The World Conservation Union, 122 pp. Gland, Switzerland and Cambridge (Reino Unido).
- JACKSON, T. J., 1993. «Measuring surface soil moisture using passive microwave remote sensing». *Hydrological Processes*, 7, 137-152.
- JACOBS, A.F.M.; HEUSINKVELD, B.G., y BERKOWICZ, S.M., 1999. «Dew deposition and drying in a desert system: A simple simulation model». *Journal of Arid Environment*, 42, 211-222.
- KIM, C. P., 1995. «The water budget of heterogeneous areas. Impact of soil and rainfall variability. University of Wageningen», *PhD Thesis, the Netherlands*.
- KOSMAS, C.; DANALATOS, N. G.; POESEN, J., y VAN WESEMAEL, B., 1998. «The effect of water vapour adsorption on soil water content under Mediterranean climatic conditions». *Agricultural Water Management*, 36, 157-168.
- KOSMAS, C.; MARATHIANOU, M.; GERONTIDIS, S.; DETSIS, V., TSARA, M., y POESEN, J., 2001. «Parameters affecting water vapour adsorption by the soil under semi-arid climatic conditions». *Agricultural Water Management*, 48, 61-78.
- LANGE, J. y LEIBUNDGUT, C., 2003. «Surface runoff and sediment dynamics in arid and semi-arid regions». En: *Understanding water in a dry environment: hydrological processes in arid and semi-arid zones*, *International contributions to hydrogeology*, 23, 115-150. Ed. I. Simmers. A. A. Balkema Publishers, Lisse (Holanda).
- LLOYD, J. W., 1986. «A review of aridity and groundwater». *Hydrological Processes*, 1, 63-78.
- MONTEITH, J. L., 1957. «Dew». *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 83, 322-341.
- NASH, D. J., 1999. «Arid Geomorphology». *Progress in Physical Geography*, 23(3), 429-439.
- PUIGDEFABREGAS, J.; DEL BARRIO, G.; BOER, M. M.; GUTIÉRREZ, L. y SOLÉ, A., 1998. «Differential responses of hillslope and channel elements to rainfall events in a semi-arid area». *Geomorphology*, 23, 337-351.
- ROSE, D. A., 1968. «Water movement in dry soils. I. Physical factors affecting sorption of water by dry soils». *Journal of Soil Science*, 19(1), 81-93.
- SCANLON, B. R., 1994. «Water and heat fluxes in desert soils. 1. Field studies». *Water Resources Research*, 30, 709-719.
- SCANLON, B. R.; TYLER, S. W. y WIERENGA, P. J., 1997. «Hydrologic issues in arid, unsaturated systems and implications for contaminant transport». *Reviews of Geophysics*, 35(4), 461-490.
- SOLÉ-BENET, A.; CALVO, A.; CERDA, A.; LÁZARO, R.; PINI, R. y BARBERO, J., 1997. «Influences of micro-relief patterns and plant cover on runoff related processes in badlands from Tabernas (SE Spain)». *Catena*, 31, 23-38.
- TAIZ L. y ZEIGER E., 1991. *Plant Physiology*. Benjamin/Comminings Publishing Company, 565 pp. Redwood City, California (USA).
- UNEP, 1997. *World Atlas of Desertification*. 2<sup>nd</sup> Edition. United Nations Environment Programme. Nairobi (Kenya).
- VERHOEF, A.; DÍAZ-ESPEJO, A.; KNIGHT, J. R.; VILLAGARCÍA, L., y FERNÁNDEZ, J. E., 2006. «Adsorption of water vapour by bare soil in an olive grove in Southern Spain». *Journal of Hydrometeorology*, 7(5), 1011-1027.
- YAIR, A., 1990. «Runoff generation in a sandy area, the Nizzana sands western Negev, Israel». *Earth Surface Processes and Landforms*, 15, 597-609.



# Sodio en plantas $C_4$

OLGA LASTRA CABEZAS\*

## Resumen

El estudio de plantas  $C_4$  no es tarea simple debido a que no están circunscritas a una familia ni a un género. Desde 1966, las investigaciones al respecto han estado orientadas a identificar estas especies y, asimismo, a ampliar el conocimiento sobre su particular metabolismo. El sodio es abundante en la naturaleza, su rol en las plantas aún se mantiene sin aclarar, sin embargo, se ha considerado esencial para la mayoría de las plantas  $C_4$ . Las evidencias parecen indicar que este elemento se encuentra involucrado en la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP) que tiene lugar en las células del mesófilo. La existencia de diferentes sistemas enzimáticos en el proceso de la descarboxilación de ácidos  $C_4$  impide la generalización de las observaciones y obliga a considerar estas diferencias, hecho que en las primeras décadas se desconocía. Por tanto, en la actualidad, la identificación de las especies  $C_4$  debe ir ligado al tipo del sistema enzimático involucrado en la descarboxilación del ácido  $C_4$ . Los estudios sobre nutrientes minerales en especies  $C_4$  se ha restringido principalmente al rol del sodio; su deficiencia provoca clorosis y necrosis o problemas en la floración.

## Summary

$C_4$  plant species are not easy to study since they do not correspond to a single family or a genre. Since 1966, investigations have been focused to identifying these species and also having a better knowledge of their metabolism. Sodium is an abundant element in nature and is considered essential to most  $C_4$  plants. The evidences seem to point out that this element is found involucrated in the conversion of the pyruvate to PEP, which takes place in the mesophyll cells. The occurrence of various enzyme systems during  $C_4$  acid decarboxylation does not permit to formulate general observations, forcing us to find the differences for each system. Thus,  $C_4$  plant species identification also demands to know the kind of enzymatic mechanism for such species. The study of mineral nutrients is limited mainly to the sodium role in these species; the lack of sodium being the cause of chlorosis, necrosis or blooming problems.

## Generalidades sobre nutrición mineral de las plantas

Los tejidos vegetales contienen alrededor de 80-85 % de agua, en tanto el residuo seco está constituido por 90-95 % de carbono, hidrógeno y oxígeno que proviene del aire y del agua y, el resto, corresponde al contenido mineral de las plantas el cual es obtenido principalmente desde la solución del suelo a través del sistema radicular.

Para un desarrollo y crecimiento normal las plantas requieren de elementos minerales denominados esenciales. Sin embargo, la raíz posee una capacidad limitada para la absorción selectiva de los nutrientes minerales que están asociados a su crecimiento, puede absorber tanto elementos esenciales como no esenciales para el desarrollo, pero en cierta medida algunos minerales serán más preferidos que otros.

El criterio de esencialidad en las plantas fue establecido primeramente por Arnon y Stout en 1939 y luego modificado por Epstein en 1965. Según este criterio un elemento es esencial cuando:

- una planta debe ser incapaz de completar su ciclo de vida en su ausencia;
- su función no puede ser reemplazada por otro elemento, es decir, debe ser totalmente específica;
- el elemento esencial debe ser identificado como integrante de un metabolito u otra estructura química de la planta.

Para los fisiólogos vegetales dedicados a la nutrición mineral ha resultado difícil determinar cuales son los elementos esenciales en las plantas, sin embargo, la mayoría concuerda en diecisiete nutrientes incluidos Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O). Se les clasifica en macronutrientes y micronutrientes depen-

\* Departamento de Química Inorgánica y Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile. Casilla 233. Santiago Chile, Chile.

diendo de la concentración relativamente grande o pequeña en que se encuentran en la planta. Seis son considerados macronutrientes: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Azufre (S) y ocho, micronutrientes: Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Molibdeno (Mo), Cloro (Cl) y Níquel (Ni), (Marschner, 1995). Estos dos últimos no son esenciales para todas las plantas y han sido incorporados por Broyer *et al.* en 1954 y Brown *et al.* en 1987, respectivamente. La nómina de estos elementos ha ido variando en el tiempo, pues el reconocimiento de la calidad de esencial ha sido paralelo con los avances en la química analítica donde se ha podido contar con técnicas que poseen límites de detección y cuantificación cada vez menores. En el futuro aún podrá ser más extensa; así Kabata-Pendias y Kabata (2001) ya menciona a diecisiete elementos esenciales trazas: Aluminio (Al), B, Bromo (Br), Cl, Cobalto (Co), Cu, Flúor (F), Fe, Yodo (I), Mn, Mo, Ni, Rubidio (Rb), Silicio (Si), Titanio (Ti), Vanadio (V) y Zn.

Como se puede observar el sodio no está incluido entre éstos, sólo se le menciona como un elemento beneficioso, sin embargo, estudios efectuados en plantas  $C_4$  demuestran que este elemento es esencial para la mayoría de las especies que presentan este proceso metabólico; las bases que sustentan su esencialidad serán abordadas posteriormente.

Los nutrientes esenciales cumplen funciones muy específicas en la planta ya sea, como constituyente de la materia orgánica, como activador de reacciones enzimáticas o como transportador de carga u osmoregulador. De esta manera, nitrógeno, azufre y fósforo forman parte de proteínas y ácidos nucleicos; magnesio y micronutrientes pueden ser constituyentes de materia orgánica principalmente enzimas o estar involucrados como catalizadores en reacciones enzimáticas; y potasio, mantiene el equilibrio electroquímico, actúa como osmoregulador y también tiene un importante rol en la activación de muchas enzimas. Además de la incidencia de factores externos en la absorción también hay factores intrínsecos del vegetal gobernados por el material genético; así los requerimientos de estos nutrientes minerales son específicos para cada especie y las concentraciones pueden variar considerablemente dependiendo de la edad de la planta y la concentración de otros elementos esenciales.

Se debe destacar que los estudios sobre nutrición mineral de las plantas han evidenciado que la respuesta

de las mismas a las concentraciones de elementos esenciales (curva de crecimiento), está caracterizada inicialmente por un aumento en el crecimiento a medida que aumenta la concentración (rango deficiente), hasta llegar a una óptima donde el crecimiento se mantiene estableciéndose una meseta (rango adecuado), pero luego concentraciones mayores provocan efectos negativos en la planta y el crecimiento disminuye (rango de toxicidad). A través del análisis foliar es posible efectuar una evaluación del estado nutricional de las plantaciones.

Considerando las particularidades que presenta el sodio en las plantas  $C_4$  ha sido el nutriente más estudiado en estas especies.

## Sodio generalidades

El sodio ( $Z = 11$ ) pertenece al Grupo IA —metales alcalinos— del sistema periódico, responde a la configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^1$  y tiene sólo un estado de oxidación +1,  $Na^+$ , por pérdida del electrón del nivel  $3s^1$ . Es abundante en la naturaleza y al igual que los otros elementos de este grupo nunca se encuentra en el estado elemental porque reacciona rápidamente con los no metales. Para el ser humano y los animales, el sodio es un elemento fundamental para el mantenimiento del equilibrio iónico y la presión osmótica en las células y fluidos corporales, entre otras funciones (Harrison, 1991); sin embargo, sorprende que no cumpla funciones tan vitales en las plantas y que sólo se haya reconocido como nutriente esencial en especies  $C_4$  ya que para la mayoría es considerado un elemento beneficioso. En funciones similares a las desempeñadas por el sodio —como electrolito— en los animales, la mayoría de las plantas prefieren el potasio.

## Estudio de la esencialidad del sodio en plantas $C_4$

La existencia de plantas  $C_4$  fue reconocida a mediados de la década de 1960 por M.D. Hatch y C.R. Slack. Anatómicamente se caracterizan por poseer una estructura foliar del tipo Kranz (del alemán Kranz: corona), donde las células clorofílicas se encuentran dispuestas en dos capas concéntricas alrededor de los haces conductores de savia; una capa interna que corresponde a células de la vaina vascular y una capa

externa a células del mesófilo comunicadas entre sí por los plasmodesmos. Para el desarrollo fotosintético C<sub>4</sub> es fundamental una actividad coordinada de ambos tipos de células.

En las últimas cuatro décadas se han desarrollado numerosos trabajos para estudiar el rol del sodio en las plantas C<sub>4</sub>. Para Brownell y colaboradores, quienes han entregado valiosa información al respecto (Brownell, 1965; Brownell, 1967; Brownell y Crossland, 1972; Brownell *et al.*, 1991; Brownell y Bielg, 1996; Grof *et al.*, 1986a; Grof *et al.*, 1986b; Grof *et al.*, 1989; Johnston *et al.*, 1984; Johnston *et al.*, 1988), el sodio es un elemento esencial para estas plantas como micronutriente, (Brownell, 1967). Sin embargo, otros investigadores, sostienen que si bien el sodio cumple una función especializada en algunas especies C<sub>4</sub>, consideran que dicha función es aún insuficiente para incluirlo dentro de los nutrientes esenciales de plantas superiores y recomiendan una revisión del criterio de esencialidad puesto que además deberían incluir dentro de esta categoría aquellos elementos que promueven un máximo producto o biomasa y/o aquellos que reducen el requerimiento (nivel crítico) de un elemento esencial; como alternativa a éstos últimos sugieren también llamarles «nutrientes funcionales» y entre éstos sitúan al sodio y probablemente también al silicio y selenio (Subbarao *et al.*, 2003).

Actualmente, se acepta que el sodio es un nutriente esencial para la mayoría de las plantas C<sub>4</sub> y así lo demuestran los ensayos efectuados por Brownell (1965), Brownell (1967), Brownell y Crossland (1972) en plantas C<sub>4</sub> (quince especies) y C<sub>3</sub> (doce especies) cultivadas en soluciones nutritivas con concentraciones de sodio 0,08 µM y 0,1 mM.

Las especies estudiadas pertenecen a cinco familias: Gramineae y Cyperaceae del grupo de las Monocotiledóneas y Amaranthaceae, Chenopodiaceae y Portulacaceae de las Dicotiledóneas. Las plantas C<sub>4</sub> cultivadas en solución 0,1 mM de Na presentaron más altos rendimientos (g peso seco / planta) que aquéllas en 0,08 µM, con diferencias significativas entre los tratamientos, que fluctuaron entre los niveles de  $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,05$ , mientras que en plantas C<sub>3</sub> de las doce especies estudiadas solo dos: *Hordeum vulgare* L. c.v. Pallidum y *Atriplex hortensis* L. var. Atrosanguineae presentaron diferencias al nivel de  $P \leq 0,05$ . Además en las plantas C<sub>4</sub> cultivadas en soluciones 0,08 µM de Na<sup>+</sup> se observaron síntomas de deficiencia; la mayoría (diez especies) presentaron clorosis y necrosis, tres solo cloro-

sis. En *Portulaca grandiflora*, Hook clorosis y problemas en la formación de las flores y en *Halogeton glomeratus*, hojas pequeñas enroscadas con tendencia a la marchitez; en tanto que, en las especies C<sub>3</sub> no se presentaron síntomas de deficiencia. También es importante destacar que en los géneros *Atriplex* y *Kochia*, que incluyen especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, solamente las especies C<sub>4</sub> respondieron positivamente al sodio. Estos antecedentes permitieron a los autores concluir que el sodio es un elemento esencial para estas plantas C<sub>4</sub>. La posible razón que explica la diferencia en la respuesta a sodio de cloroplastos de plantas C<sub>3</sub> en relación a los cloroplastos del mesófilo de las C<sub>4</sub>, es que éstos últimos tienen una contraparte fisiológica que no la tienen los cloroplastos de las plantas C<sub>3</sub> (Hatch 1976). En la Tabla 1 se presentan las especies C<sub>4</sub> incluidas en el ensayo junto el rendimiento relativo (%) obtenido por aquéllas cultivadas en soluciones deficientes respecto a las cultivadas en solución nutritiva 0,1 mM de Na<sup>+</sup>.

TABLA 1  
Rendimiento (%) de plantas C<sub>4</sub> cultivadas en solución nutritiva 0,08 µM de Na<sup>+</sup> respecto a las crecidas en solución 0,1 mM de Na<sup>+</sup>

Especies C <sub>4</sub>	Rendimiento (%) <sup>*</sup>
<b>MONOCOTILEDÓNEAS</b>	
Gramineae	
<i>Echinochloa utilis</i> L. Ohwi et Yabuno	56,7
<i>Cynodon dactylon</i> L.	33,7
Cyperaceae	
<i>Kyllinga brevifolia</i>	50,4
<b>DICOTILEDÓNEAS</b>	
Amaranthaceae	
<i>Amaranthus tricolor</i> L. cv. 'Early Splendour'	42,1
Chenopodiaceae	
<i>Atriplex nummularia</i> Lindl.	20,0
<i>Atriplex paludosa</i> R.Br.	7,7
<i>Atriplex quinii</i> Fv. M.	14,2
<i>Atriplex semibaccata</i> R.Br.	15,9
<i>Atriplex inflata</i> Fv.M.	2,1
<i>Atriplex leptocarpa</i> Fv.M.	3,8
<i>Atriplex spongiosa</i> Fv.M.	4,6
<i>Atriplex vesicaria</i> Heward ex Benth	10,1
<i>Kochia childsii</i> Hort.	28,2
<i>Halogeton glomeratus</i> (Bieb) Meyer	35,6
Portulacaceae	
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	30,7

\* Cálculos basados en datos de Brownell y Crossland (1972) El rendimiento fue evaluado por los autores como g peso seco /planta.

El rendimiento relativo calculado para cada una de las especies  $C_4$  con los datos proporcionados por los autores permite visualizar que las especies del género *Atriplex* fueron las más afectadas con la deficiencia; dichos valores variaron entre 2,1 % y 20 %, siendo para *Atriplex inflata* Fv.M. el menor; en las otras especies  $C_4$  el rendimiento fue de 60 % o menor. Estas diferencias se podrían atribuir a que las necesidades por este ión, como ocurre con los otros nutrientes minerales, varían de una especie a otra, pero es evidente que las plantas  $C_4$  requieren de sodio para su crecimiento y desarrollo normal.

### Función del sodio en plantas $C_4$

Previamente se debe destacar que en plantas  $C_4$ , se pueden distinguir 3 tipos diferentes de fotosíntesis y éstas se relacionan con los compuestos  $C_4$  formados (malato o aspartato) y las enzimas descarboxilantes en las células de la vaina vascular. Así, se han reconocido los tipos donde participa la enzima málica dependiente del NADP (NADP-ME), la enzima málica dependiente del NAD (NAD-ME) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEP-CK) (Edward y Walker, 1983). Estas diferencias son las que no permiten hacer generalizaciones respecto a plantas  $C_4$ , por esta razón es fundamental conocer el tipo de fotosíntesis  $C_4$  que desarrolla la planta que está sometida a estudio.

Aunque, en general, se conoce poco del rol del sodio en las plantas, pareciera que anatómicamente en plantas  $C_4$  se encuentra radicado en las células del mesófilo e involucrado en la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP). Estas estructuras anatómicas son las más afectadas por deficiencia de sodio y se presentaron tanto en *Amaranthus tricolor* (tipo NAD-ME) como en *Kochia childsii* (tipo NADP-ME); en éstas el número de tilacoides apilados por grana son menores que en plantas normales a nivel de  $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente. En cambio, en las células de la vaina vascular en *A. tricolor* no se observan diferencias anatómicas mientras que en *K. Childsii*, tanto en plantas deficientes como normales, no se observó grana o fue muy escasa como se ha encontrado en otras plantas  $C_4$  tipo NADP-ME (Grof *et al.*, 1989). El número de tilacoides por grana tiene relación con la protección que ejercen los carotenos sobre los pigmentos clorofílicos respecto a la decoloración provocada por la alta intensidad luminosa (Weier y Benson,

1967); y además se sugiere que proporcionaría un medio adecuado para transferir la energía entre el fotosistema II (PSII) y el fotosistema I (PSI) (Gunning y Steer, 1975).

También se ha detectado que la actividad del PSII fue evidentemente más baja en las células del mesófilo en plantas deficientes en los tres tipos de fotosíntesis  $C_4$ , representadas por *K. Childsii* (tipo NADP-ME), *Chloris gayana* (tipo PEP-CK) y *Amaranthus tricolor* (tipo NAD-ME); y la actividad del PSI fue distinta, aumentó en *A. tricolor* en cambio en *K. Childsii* no fue afectada (Grof *et al.*, 1989). Por otra parte, las mayores concentraciones de metabolitos  $C_3$ , alanina y piruvato (Grof *et al.*, 1986a), así como menores concentraciones de metabolitos  $C_4$ , fosfoenolpiruvato, ácido oxalacético, malato, aspartato y 3- fosfoglicerofosfato observadas en plantas  $C_4$  deficientes, reafirman el efecto del sodio en la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato lo cual podría ser atribuido a un suministro limitado de ATP desde la fosforilación fotosintética, o bien, aunque es poco probable a la actividad reducida del enzima que cataliza esta reacción, la piruvato fosfodiquinasa (Grof *et al.*, 1989). Las alteraciones estructurales pueden explicar las diferencias observadas en la fluorescencia y en el transporte electrónico (Grof *et al.*, 1986b).

Por otra parte, en células del mesófilo de cloroplastos aislados de *Kochia trichophylla* (tipo NADP-ME) deficientes en sodio, se encontró que la tasa de formación de PEP, a partir de piruvato, aumentó en presencia de oxalacetato, lo cual muestra la dependencia de la fotofosforilación no-cíclica para el suministro del ATP requerido para la conversión de piruvato a PEP. También en estas células, la formación de PEP fue superior en las provenientes de plantas  $C_4$  crecidas con suministro de sodio, que en deficientes tanto en la fotosíntesis tipo NADP-ME (*Kochia trichophylla*) como en las NAD-ME (*Panicum miliaceum*). Un daño irreversible se produjo cuando se aislaron los cloroplastos en ausencia de sodio y finalmente, concluyen que el sodio sería requerido para mantener la integridad funcional de los cloroplastos del mesófilo (Brownell y Bielg, 1996).

Altas concentraciones de  $CO_2$  ( $1500 \mu L CO_2 L^{-1}$ ) disminuyeron los síntomas de deficiencia de sodio en *Amaranthus tricolor* y *Atriplex spongiosa*, ambas especies del tipo NAD-ME. En *A. tricolor* en condiciones de baja concentración de  $CO_2$ , los síntomas de deficiencia se acentuaron ( $15 \mu L CO_2 L^{-1}$ ). Por otra parte, plantas  $C_3$  y  $C_4$  que crecieron en medios deficientes en  $Na^+$  y en

concentraciones crecientes de  $\text{CO}_2$ , aumentaron el crecimiento y el contenido de clorofila. Sin embargo, plantas  $C_4$  suficientes en sodio fueron relativamente no afectadas cuando se sometió a tratamiento con  $\text{CO}_2$  (Johnston *et al.*, 1984); lo cual podría indicar que cuando el sodio es suficiente para la planta, la concentración de  $\text{CO}_2$  producto de la descarboxilación de metabolitos que provienen de las células del mesófilo, son los adecuados para el normal funcionamiento y solo en situación de deficiencia, cuando el  $\text{CO}_2$  producido resulta escaso, aprovecha entonces el suministrado externamente.

Se ha observado además, otro factor que puede incidir en la tasa fotosintética de plantas  $C_4$ , es la actividad de la anhidrasa carbónica. En plantas deficientes de *A. tricolor* (tipo NAD-ME) y *K. childsii* (tipo NADP-ME), la actividad de la anhidrasa carbónica fue el doble de las normales (Brownell *et al.*, 1991).

Es posible observar que aún persisten muchas incógnitas en relación al rol del sodio en las plantas  $C_4$ . Respecto a la fijación de  $\text{CO}_2$ , a medida que la investigación avanza, aumentan los factores a considerar; así se han detectado en la familia Cyperaceae otras variantes en la estructura de Kranz, las cuales podrían facilitar o dificultar el trabajo combinado de los dos tipos de células pues tiene relación con el ordenamiento de células en el tejido foliar (Soros y Dengler, 2001). Aunque está menos estudiado también en las células del mesófilo, se ha involucrado al sodio en la asimilación de nitrato. Así, en *A. tricolor* la actividad de la nitrato reductasa fue muy baja en plantas deficientes en sodio y se recuperó adicionando este elemento (Ohta *et al.*, 1987). También la actividad de esta enzima se vio favorecida en *Panicum coloratum*, *Panicum dichotomiflorum*, *Panicum maximum* y *Chloris gayana* cuando se aplicó sodio; sin embargo no aumentó en *Zea mays* y *Panicum miliaceum* (Ohta *et al.*, 1988).

Marschner (1995) señala la necesidad de incorporar en estos estudios, especies como maíz y caña de azúcar que son  $C_4$ , pero natrofóbicas. Señala además que es fundamental diferenciar los mecanismos de plantas  $C_4$  en los estudios sobre el rol del sodio e incluir otras funciones metabólicas.

Los estudios de nutrientes minerales en plantas  $C_4$  principalmente se centran en sodio, probablemente por el importante rol que juega este elemento en el metabolismo de estas plantas. Resultará interesante en el futuro incorporar en estos estudios los otros elementos esenciales lo cual entregará una visión más global de lo que

ocurre realmente en la planta. La nutrición mineral de las plantas es una nutrición equilibrada que según los principios de Homès (1963), es una expresión fundamental de la interacción simultánea entre todos los nutrientes la cual no puede ser desligada de su acción individual, de modo que es necesario que se produzca un equilibrio entre la intensidad de todos estos diversos efectos individualmente.

En esta dirección, Matoh *et al.* (1986) encontraron en *A. Tricolor* L. Cv. Tricolor, que la materia seca fue tres veces superior en plantas crecidas en solución nutritiva con 0,5 mM de  $\text{Na}^+$  y, al mismo tiempo, que las concentraciones de potasio y nitrógeno fueron más bajas mientras las de calcio, clorofila y betacianina fueron superiores respecto a las plantas provenientes de medios sin adición de sodio. Lo más probable es que el  $\text{Na}^+$  en algunos aspectos reemplace al potasio (Marschner, 1995).

En especies  $C_4$  se ha observado mayor materia seca por unidad de nitrógeno foliar que en especies  $C_3$  y esta mejor eficiencia presumiblemente está relacionada al bajo gasto de nitrógeno en enzimas proteicas usadas por los cloroplastos para fijar  $\text{CO}_2$ . En especies  $C_4$  solamente 5 - 10 % de la proteína foliar soluble es encontrada como RuBP carboxilasa comparada con el 30 - 60% en especies  $C_3$ . Sin embargo si el más bajo contenido crítico de deficiencia de nitrógeno puede ser una ventaja para producir biomasa en sitios pobres en nitrógeno, puede también ser una desventaja desde el punto de vista de la calidad nutricional si se trata del forraje (Brown, 1985).

De acuerdo a lo señalado anteriormente, la identificación de especies  $C_4$  ha sido compleja, Downton (1975) recopilando información encuentra al menos 485 especies pertenecientes a 117 géneros y a 13 familias; y actualmente otros investigadores, considerando las ventajas ecológicas o económicas que puede estar asociada a alguna de éstas, han continuado preocupados para identificar las especies  $C_4$  autóctonas presentes en sus países, así, recientemente Wang (2006a, 2006b) identificó las plantas  $C_4$  autóctonas que crecen en Xinjiang y en Yunnan.

## Conclusiones

Muchos esfuerzos se han dedicado en la investigación sobre las especies  $C_4$ , sin embargo, aún no está claro el rol que desempeña el sodio en estas plantas,

pero se ha concluido que es un micronutriente esencial para éstas y que su función en la fotosíntesis la desarrolla a nivel de las células del mesófilo, en la conversión de piruvato a PEP. Los estudios efectuados en relación al sodio en plantas  $C_4$  indican que es fundamental abordar el tema diferenciando entre los distintos tipos de fotosíntesis  $C_4$ . Además es necesario considerar las variantes de la estructura de Kranz detectadas en la familia Cyperaceae, en especial referidas a cambios anatómicos que facilitan o dificultan la comunicación entre las células del mesófilo y las de la vaina vascular.

## Referencias bibliográficas

- ARNON, D.I. y STOUT, P.R., 1939. «Photosynthesis: the path of carbon». En: *Plant Biochemistry*. 562. Ed. J Bonner, J.E. Varner. Academic Press. New York (USA).
- BROWN, R.H., 1985. «Growth of  $C_3$  and  $C_4$  grasses under low N levels». *Crop Science*, 25, 954-957.
- BROWN, P.H.; WELCH, R.M. y CARY, E.E., 1987. «Nickel: a micronutrient essential for higher plants». *Plant Physiology*, 85, 801-803.
- BROWNELL, P.F., 1965. «Sodium as an essential micronutrient element for a higher plant. (*Atriplex vesicaria*). *Plant Physiology*, 40, 460-468.
- BROWNELL, P.F., 1967. «Sodium as an essential micronutrient element for a higher plants». *Plant Soil*, 28, 161-164.
- BROWNELL, P.F. y CROSSLAND, C.J., 1972. «The requirement for sodium as a micronutrient by species having the  $C_4$  dicarboxylic photosynthetic pathway». *Plant Physiology*, 49, 794-797.
- BROWNELL, P.F.; BIELIG, L.M. y GROF, C.P.L., 1991. «Increased carbonic anhydrase activity in leaves of sodium-deficient  $C_4$  plants». *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 589-592.
- BROWNELL, P.F. y BIELIG, L.M., 1996. «The role of sodium in the conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of  $C_4$  plants». *Australian Journal of Plant Physiology*, 23, 171-177.
- BROYER, T.C.; CARLTON, A.B.; JOHNSTON, C.M. y STOUT, P.R., 1954. «Chlorine- a micronutrient element for higher plants». *Plant Physiology*, 29, 526-532.
- DOWNTON, W.J.S., 1975. «The occurrence of  $C_4$  photosynthesis among plants». *Photosynthetica*, 9, 96-105.
- EDWARD, G.E. y WALKER, D.A., 1983.  *$C_3$ ,  $C_4$ : Mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis*. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford (UK).
- EPSTEIN, E., 1965. «Mineral metabolism». En: *Plant Biochemistry*, 438-466. Ed. J.Bonner and J.E.Varner. Academic Press, New York ( USA).
- GROF, C.P.L.; JOHNSTON, M. y BROWNELL, P.F., 1986a. «*In vivo* chlorophyll *a* fluorescence in sodium-deficient  $C_4$  plants». *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 589-595.
- GROF, C.P.L.; JOHNSTON, M. y BROWNELL, P.F., 1986b. «Free amino acid concentrations in leaves of sodium-deficient  $C_4$  plants». *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 343-346.
- 1989. «Effect of sodium nutrition on the ultrastructure of chloroplasts of  $C_4$  plants». *Plant Physiology*, 89, 539-543.
- GUNNING, B.E.S. y STEER, M.W., 1975. *Ultrastructure and the Biology of Plants Cells*. Ed. Edward Arnold. London(UK).
- HARRISON, T.R., 1991. *Harrison's principles of internal medicine*. 12 th ed., Mc Graw Hill, Inc, New York (USA).
- HATCH, M.D., 1976: «Photosynthesis: the path of carbon». En : *Plant Biochemistry*. Ed. J Bonner, JE Varner. Academic Press, p 797-844. New York (USA).
- HATCH, M.D. y SLACK, C.R., 1966. «Photosynthesis of sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation». *Biochemical Journal*, 101, 103-111.
- HOMES, M.V., 1963. *L'Alimentation minérale équilibrée des végétaux*. Ed. Universa- Wetteren (Belgica).
- JOHNSTON, M.; GROF, C.P.L. y BROWNELL, P.F., 1984. «Responses to ambient  $CO_2$  concentrations by sodium-deficient  $C_4$  plants». *Australian Journal of Plant Physiology*, 11, 137-141.
- 1988. «The effect of sodium nutrition on the pool sizes of intermediates of the  $C_4$  photosynthetic pathway». *Australian Journal of Plant Physiology*, 15, 749-760.
- KABATA-PENDIAS, A. y PENDIAS, H., 2001. *Trace elements in soil and plants*. Ed. CRC Press, Boca Raton (USA).
- MARSCHNER, H., 1995. *Mineral Nutrition of higher plant*. Ed. Academic Press Limited, London (UK).
- MATOH, T.; OHTA, D. y TAKAHASHI, E., 1986. «Effect of sodium application on growth of *Amarantus tricolor* L.». *Plant and Cell Physiology*, 27, 187-192.
- OHTA, D.; MAATOH, T. y TAKAHASHI, E., 1987. «Early responses of sodium-deficient *Amaranthus tricolor* L. plants to sodium application». *Plant Physiology*, 84, 112-117.
- OHTA, D.; MATSUI, J.; MATOH, T. y TAKAHASHI, E., 1988. «Sodium requirement of Monocotyledonous  $C_4$  plants for growth and nitrate reductase activity». *Plant and Cell Physiology*, 29, 1429-1432.
- SOROS, C.L. y DENGLER, N.G., 2001. «Ontogenic derivation and cell differentiation in photosynthetic tissues of  $C_3$  and  $C_4$  Cyperaceae». *American Journal of Botany*, 88, 1258-1265.
- SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; BERRY, W.L. y WHEELER, R.M., 2003. «Sodium – A functional plant nutrient». *Critical Reviews in Plant Science*, 22, 391-416.
- WANG, R.Z., 2006a. «The occurrence of  $C_4$  photosynthesis in Yunnah province, a tropical region in south-western China». *Photosynthetica*, 44, 286-292.
- 2006b. «The occurrence of  $C_4$  plants and their morphological functional types in the vegetation of Xinjiang, China». *Photosynthetica*, 44, 293-298.
- WEIER, T.E. y BENSON, A.A., 1967. «The molecular organization of chloroplast membranes». *American Journal of Botany*, 54, 389-402.

# Influencia de la salinidad en la germinación de especies del género *Atriplex*

ANA B. ROBLES,  
JUAN A. CARDOSO  
y M<sup>a</sup> EUGENIA RAMOS\*

## Resumen

Las especies del género *Atriplex* son muy frecuentes en las zonas áridas y semiáridas de la Cuenca Mediterránea, y están bien adaptadas a vivir en ambientes secos y salinos. Especies nativas como *A. glauca*, *A. halimus* y *A. semibaccata* son de gran interés tanto en la restauración de áreas erosionadas, como en la alimentación del ganado. Dada la dificultad que presentan las plantas para establecerse en los medios ricos en sales, el objetivo de nuestra investigación ha sido determinar en estas especies: i) el efecto de distintos niveles de salinidad (0; 100; 200; 400 y 800 mM) en la germinación y, ii) la capacidad de recuperación de las semillas cuando cesa el estrés salino. En todas las especies las semillas germinaron mejor en un medio no salino (% G control = 95-93%) y les perjudicó el incremento de salinidad (% G 800mM = 6-7%), mostrando una correlación negativa entre el porcentaje de germinación y la concentración salina ( $R^2 = 93-94\%$ ). De igual forma, la velocidad de germinación fue mayor en agua destilada, grupo control (TI = 46 - 48) y menor con la máxima concentración salina, 800 mM (TI = 1,7 - 2,3). Después de 20 días, las semillas fueron transferidas a agua destilada y en todos los casos hubo un porcentaje de recuperación superior al 50%. La recuperación se incrementó positivamente según aumentó la concentración salina (100mM = 53-60%; 200mM = 60-68%, 400 mM = 70-85 %, 800 mM = 85-91%). En todas las concentraciones, el porcentaje final de germinación (82-92%) fue próximo al obtenido en agua destilada (92-95%). Nuestros resultados indican que la germinación a altas concentraciones salinas no inhibe la germinación de manera permanente y la dormancia de las semillas parece estar producida por los bajos potenciales osmóticos que presentan los suelos salinos.

## Summary

*Atriplex* species are very frequent in the arid and semiarid zones of the Mediterranean basin and are capable to live in dry and saline environments. Native species such as *A. glauca*, *A. halimus* and *A. semibaccata* are of great interest both in the recovery of eroded areas and as feed for livestock. Due to the problems showed by these plants to establish in sites with high levels of salinity, the objective of

our research was to determine the effects on germination of different salinity levels (0; 100; 200; 400 y 800 mM) and their recovery capacity when salt stress is relieved. All species germinate better in a non saline environment (% G control = 95-93%) and an increase of salinity affect them (% G 800mM = 6-7%), showing a negative correlation between the germination percentage and salt concentration ( $R^2 = 93-94\%$ ). Germination speed was higher in the distilled water control group (TI = 46 - 48) and lower at the highest salt concentration 800 mM (TI = 1,7 - 2,3). After 20 days, seeds were transferred to distilled water and in all cases there was a recovery percentage higher than 50%. Recovery increased positively with higher salt concentrations (100mM = 53-60%; 200mM = 60-68 %, 400 mM = 70-85 %, 800 mM = 85-91). In all concentrations, the final germination percentage (92-95%) was close to the germination percentage in the distilled water control group. Our results show that high salt concentrations do not inhibit permanently germination and seed dormancy seems to be due to the lower osmotic potentials produced by different salt concentrations.

## Introducción

En las zonas de clima árido abundan los terrenos salinos, principalmente colonizados por especies xerófitas y halófitas. Más de 1100 especies halófitas se encuentran en la Cuenca Mediterránea, en su mayoría pertenecen a la familia Chenopodiaceae (30 %) que, frecuentemente, presentan comportamiento fisiológico  $C_4$ , lo que incrementa su adaptación a estos medios. Estas especies, muestran un gran interés, tanto en la restauración de áreas erosionadas, como en la alimentación del ganado (Le Houérou, 2000), y son una alternativa para aumentar la productividad de estas zonas marginales. Entre estas especies destacan las del género *Atriplex* L. por su alto contenido en proteína y su alto valor nutritivo (Correal, 1993; Le Houérou, 1992; El Shatnawi and Mohawesh, 2000; Andueza *et al.*, 2005; Barroso *et al.*, 2005). Desde un punto de vista ecológico, presentan una gran plasticidad, por lo

\* Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1. 18008-Granada, España.

que se adaptan tanto a los ambientes secos como a los salinos (Standley, 1916; Osmond *et al.*, 1980).

Sin embargo, muchas de estas especies presentan bajos porcentajes de regeneración natural y establecimiento en campo tras la siembra, que por lo general se debe a la dormancia o dificultad de germinar de sus semillas (Lailhacar-Kind and Laude, 1975; Stidham *et al.*, 1980; Ansley y Abernethy, 1984).

La dormancia más extendida entre los vegetales es la física, impuesta por la dureza las cubiertas seminales, sin embargo entre las plantas halófitas es muy frecuente la dormancia secundaria inducido por las condiciones de estrés propios de los ambientes salinos (Baskin and Baskin, 1998)

La alta salinidad en el suelo es uno de los mayores factores limitantes para el desarrollo de las plantas que viven en ambientes salinos al reducir el potencial agua del suelo, esto dificulta o impide la toma de agua y alimentos por las raíces, y puede producir toxicidad por acumulo de iones  $\text{Na}^+$  en los tejidos (Lambers *et al.*, 1998; Houle *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005).

La germinación es una de las etapas más vulnerables en el ciclo de vida de las plantas, que en el caso de las plantas halófilas va estar condicionado por su mayor o menor adaptación a la concentración de sal en el suelo, lo que determina su establecimiento y distribución en estos medios salinos (Waisel, 1972; Ungar, 1991, 1995; Tobe *et al.*, 2000).

Las semillas de las especies glicofitas como las de las halófitas responde de una manera similar al incrementar el estrés salino del medio, reducen el porcentaje y la velocidad de germinación, y en el caso de muchas halófitas sus semillas muestran dormancia debido al bajo potencial del agua en el medio en que viven que impide la captación de agua por las semillas (Ungar, 1978; Keiffer and Ungar, 1997; Rubio-Casal *et al.*, 2002). La diferencia entre ambos tipo de plantas está en que las semillas de las especies halófitas son viables a pesar de permanecer expuestas durante largo tiempo a altas concentraciones de sales, conservando su capacidad de germinar cuando desaparecen estas condiciones hipersalinas (Khan and Ungar, 1996; Ungar, 1996).

El sudeste de España es el único territorio de Europa que presenta clima árido, con una precipitación anual alrededor de 300 mm, y donde son frecuentes los sustratos ricos en sales. En este trabajo hemos seleccionado 3 especies del género *Atriplex* (*A. glauca* L., *A. halimus* L., *A. semibacatta* R.Br.) que viven en los ecosistemas áridos del sudeste español, y son interesan-

tes, tanto desde el punto de vista forrajero por su buen valor nutritivo, como forestal por su adaptación a los medios adversos (xéricos, salinos, fríos). Dada la dificultad que presentan las plantas para establecerse en los medios ricos en sales, el objetivo de nuestra investigación ha sido determinar: i) el efecto de distintos niveles de salinidad en la germinación de distintas especies de los géneros *Atriplex* y, ii) la capacidad de recuperación de las semillas cuando cesa el estrés salino. Estos resultados nos permitirán conocer mejor aspectos ecofisiológicos de estas especies, indispensables para la propagación en campo de las mismas.

## Material y métodos

Se recolectaron frutos maduros de *A. glauca*, *A. halimus* y *A. semibacatta* durante el otoño del año 2003, en el litoral del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar (36° 51' N y los 2° 6' de longitud W, Almería, España). Este área protegida presenta una precipitación media anual de 193,4 mm con fuerte variación intra e interanual, y la temperatura media anual de 19,4° C (Robles *et al.*, 2002). Tras la recolección, las semillas fueron almacenadas a temperatura ambiente, hasta el momento de realizar los ensayos.

Todas las semillas fueron separadas manualmente de sus brácteas y esterilizadas con hipoclorito de sodio (3%) y peróxido de hidrógeno (7%) durante 10 y 15 minutos, para luego ser enjuagadas 3 veces con agua destilada. En cada tratamiento se utilizaron cuatro réplicas de 25 semillas cada una. Las semillas fueron puestas a germinar sobre papel de filtro en placas de Petri de 5 cm y sumergidas en 5ml de solución salina (NaCl), cuya concentración varió según tratamiento. Las distintas concentraciones salinas utilizadas fueron de: i) 0 mM (Control: agua destilada); ii) 100 mM; iii) 200 mM; iv) 400 mM y; v) 800mM.

Para determinar si las distintas concentraciones salinas afectaron, o no, a la viabilidad de las semillas, tras finalizar los ensayos, las semillas no germinadas fueron lavadas y puestas de nuevo a germinar en agua destilada (5 ml por placa).

En todos los casos, las placas de Petri fueron selladas con película de parafina (parafilm) para evitar la evaporación del agua; e incubadas en la oscuridad a 20 °C. Los recuentos de semillas se realizaron durante 20 días a intervalos de 24 horas, extrayendo las semillas germinadas (radícula > 1mm).

Para cada tratamiento los parámetros calculados fueron:

1. **Porcentaje de germinación (%G).**.- Número de semillas germinadas, respecto al número inicial de semillas puestas a germinar.

2. **Porcentaje de recuperación (%R).**.- Porcentaje de semillas germinadas en agua destilada tras la acción de los tratamientos salinos. Cuya fórmula es:

$$\% R = (a-b) / (c-b) * 100$$

Donde *a* es número total de semillas germinadas tras ser transferidas a agua destilada, *b* el número total de semillas germinadas en solución salina y *c* es el número total de semillas.

3. **Porcentaje final de germinación (%F).**.- Es la suma del porcentaje de germinación y el porcentaje de recuperación. Podemos considerar este parámetro como una medida de la viabilidad de las semillas.

4. **Índice de la tasa de germinación.**.- Se calculó tanto para la germinación (TI) como para la recuperación de semillas (TIR). Es una medida de la velocidad de germinación. Fue estimada usando el Índice de Timson modificado para la velocidad de germinación (Khan and Ungar, 1984):

$$TI = \sum G/t,$$

donde *G* es el porcentaje de semillas germinadas en intervalos de dos días, y *t* es el período total de germinación. Un valor de 100 en la escala de Timson, indica que todas las semillas germinaron en 1 día, mientras que 0 indica que ninguna semilla germinó.

Previo al análisis estadístico, los datos de germinación fueron transformados (arcoseno) para asegurar la homogeneidad de la varianza. Los datos fueron sometidos

a un test de ANOVA usando el software Statgrafic Plus 5.1, el contraste de las medias se realizó mediante el test de Duncan, al nivel de significación de 0,05. En el caso de que los datos no asumieran la normalidad se realizó un análisis no paramétrico de Kuskal-Wallis y posterior contraste de las medianas para diferenciar grupos (Test Wilcoxon- Wilcox) (Zar, 1999).

## Resultados

En todas las especies las semillas germinaron mejor en un medio no salino y disminuyó con el incremento de salinidad. De manera significativa, todas las especies mostraron los mayores porcentajes de germinación en agua destilada, grupo control (% G = 95-93%). A bajas concentraciones salinas (100 y 200 mM) las semillas tuvieron una considerable germinación, superior al 50 % (69-61 % y 60-53 % en 100 y 200 mM respectivamente) y pocas semillas germinaron en la máxima concentración salina, 800 mM (6 y 7 %) (Tabla 1) (*A. glauca*: *gl* = 4, *F* = 48,93, *p* = 0,0000; *A. halimus*: *gl* = 4, *F* = 79,98, *p* = 0,0000; *A. semibaccata*: *gl* = 4, *F* = 85,83, *p* = 0,0000). En este mismo sentido, la velocidad de germinación (índice de la tasa de germinación o índice de Timson) decreció con el incremento de salinidad, máximo en agua destilada (TI = 46 - 48) y mínimo a 800 mM (TI = 1,7 - 2,3), mostrando diferencias significativas entre las distintas concentraciones. Sólo las bajas concentraciones salinas (100-200 mM) no mostraron diferencias significativas entre ellas (Tabla 1) (*gl* = 4, *H* = 17,4645, *p* = 0,0016, para todas las especies).

TABLA1

**Porcentaje de germinación media (% G ± SE) y tasa de Germinación (TI ± SE, Índice de Timson) para tres especies del género *Atriplex* (*A. glauca*, *A. halimus*, *A. semibaccata*) bajo cinco tratamientos de salinidad durante 20 días**

Concentración	<i>Atriplex glauca</i>		<i>Atriplex halimus</i>		<i>Atriplex semibaccata</i>	
	% G	TI	% G	TI	% G	TI
Control	92a ± 2,8	46,0a ± 1,4	93a ± 1,0	46,5 a ± 2,8	95a ± 2,5	48,0a ± 1,4
100mM	61b ± 4,4	20,8b ± 4,5	69b ± 4,4	19,8ab ± 4,4	67b ± 3,4	22,6b ± 4,5
200mM	58b ± 5,3	21,3b ± 1,6	53c ± 5,0	25,3b ± 5,3	60b ± 2,8	22,5b ± 2,7
400mM	39c ± 3,8	9,8c ± 0,4	36d ± 5,1	9,5c ± 3,9	35c ± 4,4	8,75c ± 1,1
800mM	7d ± 1,9	2,0d ± 0,7	6e ± 1,0	2,3d ± 1,9	6d ± 1,2	1,7d ± 0,5

En cada especie, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas.

TABLA 2

## Correlación entre germinación (%G = Y) y concentración salina

(X: valores 0; 100; 200; 400; 800 mM).  $Y = a + b \cdot X$ . SE = error estándar;  $R^2$  = coeficiente de correlación lineal,  $F$  = coeficiente-F,  $p$  = p-valor,  $n$  = tamaño de la muestra. Significación del 95 %

Concentración	<i>a</i>	<i>B</i>	$R^2$	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>SE</i>	<i>n</i>
<i>Atriplex glauca</i>	80,05	- 95,5	93,32	41,92	0,0075	9,33	4
<i>Atriplex halimus</i>	81,70	- 101,0	93,99	46,94	0,0064	6,56	4
<i>Atriplex semibaccata</i>	83,65	- 103,5	94,36	50,15	0,0058	6,60	4

En cada especie, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas.

TABLA 3

Porcentaje de recuperación de semillas (% R  $\pm$  SE) e índice de la tasa de recuperación (TIR  $\pm$  SE, Índice de Timson) para tres especies de *Atriplex* (*A. glauca*, *A. halimus*, y *A. semibaccata*)

Concentración	<i>Atriplex glauca</i>		<i>Atriplex halimus</i>		<i>Atriplex semibaccata</i>	
	% R	TIR	% R	TIR	% R	TIR
100mM	53a $\pm$ 9,5	20,1a $\pm$ 4,1	56a $\pm$ 5,7	24,1a $\pm$ 5,5	60a $\pm$ 3,5	22,1a $\pm$ 1,1
200mM	60a $\pm$ 5,9	32,2a $\pm$ 4,1	67a $\pm$ 2,0	16,5a $\pm$ 2,0	68a $\pm$ 4,0	34,1b $\pm$ 2,0
400mM	70a $\pm$ 2,9	23,3a $\pm$ 1,0	80b $\pm$ 3,5	21,1a $\pm$ 2,3	85b $\pm$ 7,3	56,6b $\pm$ 9,9
800mM	85b $\pm$ 1,2	23,0a $\pm$ 1,9	91c $\pm$ 1,7	24,8a $\pm$ 1,9	89b $\pm$ 2,0	24,1a $\pm$ 1,2

En cada especie, las cifras con igual letra expresan que no hay diferencias significativas

Para determinar la relación entre las distintas concentraciones salinas y el porcentaje de germinación se han desarrollado las correspondientes ecuaciones de regresión entre las distintas especies estudiadas. La Tabla 2 muestra como todas las especies del género *Atriplex* presentan, con una elevada significación ( $R^2$  = 93-94%), una relación inversa entre el porcentaje medio de germinación y la concentración salina (Tabla 2). El porcentaje de germinación decrece progresivamente con el aumento de la concentración salina.

La Tabla 3 muestra los porcentajes de recuperación de las semillas de las distintas especies del género *Atriplex*, después de ser transferidas a agua destilada tras ser expuestas a distintas concentraciones salinas durante 20 días. En todas las especies y en todas las concentraciones el porcentaje de recuperación fue superior al 50% y se incrementó positivamente según aumentó la concentración salina (100mM = 53-60%; 200mM = 60-68 %, 400 mM = 70-85 %, 800 mM = 85-91 %). El porcentaje de recuperación fue significativamente mayor en la concentración salina más alta (800mM) para las especies *A. glauca* ( $gl$  = 4,  $F$  = 10,0902,  $p$  =

0,01781) y *A. halimus* ( $gl$  = 4,  $F$  = 20,26,  $p$  = 0,0001), y para *A. semibaccata* en las concentraciones de 400mM y 800 mM ( $gl$  = 4,  $H$  = 10,6471,  $p$  = 0,01379). Respecto a la velocidad de recuperación no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones para *A. halimus* ( $gl$  = 4,  $H$  = 5,17489,  $p$  = 10059427) y *A. glauca* ( $gl$  = 4,  $F$  = 2,73,  $p$  = 0,0,906). Sólo en *A. semibaccata* hubo diferencias significativas, mostrando las dos concentraciones intermedias valores mayores (200mM = 34,1 y 400mM = 56,6) ( $gl$  = 4,  $H$  = 5,17489,  $p$  = 0,00609).

En todas las especies, el porcentaje final de germinación (% F = 82-92 %) (Tabla 4) fue cercano al de las semillas puestas a germinar en agua destilada (Control = 92-95 %) (Tablas 1 y 4) y no varió significativamente para el tratamiento de mayor concentración salina (800mM). Para los otros tratamientos (100; 200 y 400mM) el porcentaje final germinación varió significativamente del control en *A. glauca* ( $gl$  = 4,  $H$  = 11,6415,  $p$  = 0,020226) y *A. halimus* ( $gl$  = 4,  $F$  = 6,42,  $p$  = 0,0032). Sólo en *A. semibaccata* no hubo diferencias significativas entre el control y todos los tratamientos ( $gl$  = 4,  $H$  = 5,12776,  $p$  = 0,274438).

TABLA 4

Porcentaje Final de germinación tras la recuperación en agua destilada, para tres especies del género *Atriplex* (*A. glauca*, *A. halimus*, *A. semibaccata*) (Semillas germinadas en concentraciones salinas + semillas recuperadas en agua destilada)

Concentración	<i>A. glauca</i>	<i>A. halimus</i>	<i>A. semibaccata</i>
	% F	%F	%F
0mM	92±2,8a	93±1,0a	95±2,5a
100mM	83±1,9b	87±1,0b	87±1,0a
200mM	84±0,0b	85±1,6b	87±4,1a
400mM	82±1,5b	88±1,6b	91±2,0a
800mM	86±1,5ab	92±1,0a	90±1,0a

En cada especie, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas

## Discusión

Las semillas de las especies halófitas presentan diferentes límites de tolerancia a la salinidad. Algunas especies que viven en saladares o depresiones salinas, frecuentemente de biotipo suculento (*Arthrocneumum*, *Halocneumum*, *Salicornia*, *Sarcocornia*, *Suaeda*...), pueden germinar a altas concentraciones de NaCl (Ungar, 1962; Pujol *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de las plantas halófitas germinan mejor en condiciones no salinas y, tanto el porcentaje como la velocidad de germinación decrece con el aumento de la salinidad (Khan, 1991; Khan y Ungar, 1996, 1999; Gulzar y Khan, 2001; Khan *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005). En este mismo sentido, las especies estudiadas del género *Atriplex*, inhibieron su germinación con un incremento de la salinidad y sólo un bajo porcentaje (6-7 %) germinó a altas concentraciones de NaCl (800 mM). También, en todas ellas, la tasa de germinación se redujo progresivamente con el aumento de salinidad. Similares resultados fueron encontrados en otras especies del género *Atriplex* como *A. cordobensis* (Giusti y Grau, 1983; Aiazzi *et al.*, 2004), *A. halimus* (Bajii *et al.*, 2001; Abbad *et al.*, 2004), *A. lampa* (Passera, 1990), *A. nummularia* (Uchiyama, 1987), *A. patula* (Ungar, 1996; Katembe *et al.*), *A. portulacoides* (Redondo *et al.*, 2007), *A. postrata* (Katembe *et al.*, 1998), *A. triangularis* (Khan y Ungar, 1984), *A. stocksii* (Khan y Rizvi, 1994; Khan *et al.*, 2006).

Tras 20 días con tratamientos salinos, las semillas que no germinaron fueron transferidas a agua destilada y alcanzaron un porcentaje final de germinación comparable al de control. La alta recuperación de semillas en agua destilada (53 - 91 %), mayor a altas concentraciones (400 MPa = 70- 85 % y 800 MPa = 85-91 %),

el alto porcentaje final de germinación (alrededor del 90 %) y la no existencia de diferencias significativas en la velocidad de recuperación de las semillas, indican que la inhibición de la germinación se debe, principalmente, al efecto negativo del potencial osmótico agua (Ungar, 1962; Houle *et al.*, 2001; Bajii *et al.*, 2002; Rubio-Casal *et al.*, 2003). El bajo potencial osmótico impide absorber agua a las semillas, lo que reduce la capacidad de germinar con alta salinidad. (Khan y Ungar, 1996; Pujol *et al.*, 2000). También, en algunas *Atriplex*, esta inhibición puede deberse a la combinación del efecto osmótico con la toxicidad específica del ion Na<sup>+</sup> (Katambe *et al.*, 1998) y/o a la presencia de ciertos compuestos inhibidores como el ácido abscísico (Giusti y Grau, 1983; Khan *et al.*, 2006), por lo que sería aconsejable realizar nuevas investigaciones en este sentido, para las especies de *Atriplex* estudiadas.

Las especies estudiadas viven en ambientes áridos y salinos del sudeste ibérico. La elevada evaporación que se produce en verano debido a las altas temperaturas, incrementa la concentración salina del suelo y disminuye su potencial agua, lo que dificulta la hidratación de las semillas e inhibe la germinación de éstas.

El requisito necesario para que se produzca la germinación es la reducción de la salinidad del suelo (Chapman, 1960), que en estos climas áridos y semiáridos ocurre en otoño y/o primavera, principalmente. Las lluvias esporádicas que ocurren en estas estaciones elevan el potencial osmótico del suelo, hidrata las semillas y rompen su dormancia (Ungar 1991; Werner y Finkelstein, 1995; Katemben *et al.*, 1998). La tolerancia de las semillas a la salinidad mientras permanecen en el suelo y su capacidad para germinar cuando la concentración salina del medio se minimiza puede considerarse como una adaptación de las plantas a la

salinidad (Ungar, 1978; Uchiyama 1987; Keiffer y Ungar, 1997; Khan *et al.*; 2000, 2001; Abbad *et al.*, 2004) y una ventaja evolutiva frente a las especies glicofitas (Ungar, 1991; Ungar, 1996). En los climas áridos, tras las lluvias escasas e irregulares, las condiciones favorables de humedad en el suelo no se mantienen durante suficiente tiempo para que las plantas se puedan establecer. Incluso, la estrategia que presentan algunas especies de aumentar la velocidad de germinación en la recuperación, tras las lluvias, puede perjudicar a la supervivencia de las plántulas y causar la muerte de las mismas (Pujol *et al.*, 2000). En las especies estudiadas la velocidad de recuperación sólo fue mayor en *A. semibaccata* a concentraciones salinas de 0,2 y 0,4 mM; respuesta que pudiera ser negativa para el posterior establecimiento de las plántulas de esta especie si el suelo no mantiene la humedad suficiente.

Estos resultados sugieren que la salinidad induce una dormancia de tipo osmótico en las especies *A. glauca*, *A. halimus* y *A. semibaccata*, que como en otras halófitas, es reversible y desaparece cuando las condiciones de humedad ambiental son propicias. Debido a la capacidad de germinar de estas especies en medios salinos, consideramos que son idóneas para incluirlas en planes de recuperación de áreas erosionada y mejora de pastos en las zonas áridas y semiáridas de la Cuenca Mediterránea.

## Referencias bibliográficas

- ABBAD, A.; EL HADRAMI, A. y BENCHABANE, A., 2004. «Germination responses of the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.) to NaCl treatment». *Journal of Agronomy*, 3 (2), 111-114.
- AIAZZI, M.T.; P.D. CARPANE, J.; ARGÜELLO, A. y PIOTTO, B., 2004. «Salt tolerance at the germination stage of seeds of *Atriplex cordobensis* from different provenances». *Seed Science and Technology*, 32, 43-52.
- ANDUEZA, D.; MUÑOZ, F.; DELGADO, I. y CORREAL, E., 2005. «Intraspecific variation in *Atriplex halimus*: chemical composition of edible biomass». *Options méditerranéennes, série A*, 67, 377-381.
- ANSLEY, R.J. y ABERNETHY, R.H., 1984. «Seed pretreatments and their effects on field establishment of spring-seeded Gardner saltbush». *Journal of Range Management*, 37, 509-513.
- BAJJI, M.; KINET, J.M. y LUTTS, S., 2002. «Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae)». *Canadian Journal of Botany*, 80, 297-304.
- BARROSO, F.G.; PEDREÑO, A.; MARTÍNEZ, T.; ROBLES, A.B. y GONZÁLEZ-REBOLLAR, J.L., 2005. «Potencialidad de las especies *C<sub>4</sub>* como alimento para el ganado en repoblaciones de zonas semiáridas». En: *Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural*, 351- 357. Eds. K. Osoro, A. Argamentería y A. Larraceleta. SERIDA, Gijón (España).
- BASKIN, C.C. y BASKI, J.H., 1998. *Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, 666 pp. San Diego (USA).
- CHAPMAN, V.J., 1960. *Salt marshes and salt deserts of the world*. Interscience Publishers Inc., 392 pp. New York (USA).
- CORREAL, E., 1993. «Grazing use of fodder shrub plantations». En: *Fodder trees and shrubs in the Mediterranean production systems: objectives and expected results of the EC research contract*. Agrimed research programme, 99-118. Ed.V. Papanastasis. Thessaloniki. ECSC-EEC-EAEC. Brussels-Luxembourg.
- EL-SHATNAWI, M.K. y MOHAWESH, Y.M., 2000. «Seasonal chemical composition of saltbush in semiarid grasslands of Jordan». *Journal of Range Management*, 53, 211-214.
- GIUSTI, L. y GRAU, A., 1983. «Inhibidores de la germinación en *Atriplex cordobensis* Gand et Stucker (Chenopodiaceae)». *Lilloa*, 36, 143-149.
- GULZAR, S. y KHAN, M.A., 2001. «Seed germination of a halophytic Grass *Aeluropus lagopoides*». *Annals of Botany*, 87(3), 319-324.
- HOULE, G.; MOREL, L.; REYNOLDS, CH.E. y SIEGEL, J., 2001. «The effect of salinity on different developmental stages of an endemic annual plant, *Aster laurentianus* (Asteraceae)». *American Journal of Botany*, 88(1), 62-67.
- KATEMBE, W.J.; UNGAR, I.A. y MITCHELL, J.P., 1998. «Effect of Salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae)». *Annals of Botany*, 82, 167-175.
- KEIFFER, C.H. y UNGAR, I.A., 1997. «The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five inland halophytes species». *American Journal* 84 (1), 104-111.
- KHAN, M.A.; GUL, B. y WEBER, D.J., 2000. «Germination responses of *Salicornia rubra* to temperature and salinity». *Journal of Arid Environments*, 45, 207-214.
- 2001. «Influence of salinity and temperature on the germination of *Kochia scoparia*». *Wetlands Ecology and Management*, 9, 483-489.
- KHAN, M.A. y RIZVI, Y., 1994. «Effect of salinity, temperature, and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *stocksii*». *Canadian Journal Botany*, 72, 475-479.
- KHAN, M.A.; AHMED, M.Z. y HAMEED, A., 2006. «Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes». *Journal of Arid Environments*, 67, 535-540.
- KHAN, M.A. y UNGAR, I.A., 1984. «Effects of salinity and temperature on the germination and growth of *Atriplex triangularis* Willd». *American Journal of Botany*, 71, 481-489.
- KHAN, M.A. y UNGAR, I.A. 1996. «Influence of salinity and temperature on the germination of *Haloxylon recurvum*». *Annals of Botany*, 78, 547-551.
- 1999. «Seed germination and recovery of *Triglochin maritima* from salt stress under different thermoperiods». *Great Basin Naturalist*, 59, 144-150.
- LAILHACAR-KIND, S. y LAUDE, H.M., 1975. «Improvement of seed germination in *Atriplex repanda* Phil». *Journal of Range Management*, 28 (6), 491-494.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S y PONS, T. L., 1998. *Plant physiological ecology*. Springer- New York, 540 pp., New York (USA).
- LE HOURÉOU, H.N., 1992. «The role of saltbushes (*Atriplex*

- spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review». *Agroforestry Systems*, 18(2), 107-148.
- LE HOUÉROU, H.N., 2000. «Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa». *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 14, 101-135.
- OSMOND, C.B.; BJÖRKMAN, O. y ANDERSON, D.J., 1980. *Physiological Process in plant Ecology. Toward a Synthesis with Atriplex*. Springer - Verlag, 468 pp. Berlin (Germany).
- PASSERA, C.B., 1990. «Efecto de la temperatura y del estrés hídrico en la germinación de «*Atriplex lampa*» moq. (Chenopodiaceae)». *Studia oecológica*, 7, 77-84.
- PUJOL, J.A.; CALVO, J.F. y RAMÍREZ-DÍAZ, L., 2000. «Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from Southeastern Spain». *Anal. of Botany*, 85, 279-286.
- 2001. «Seed germination, growth, and osmotic adjustment in response to nacl in a rare succulent halophyte from Southeastern Spain». *Wetlands*, 21, 2, 256-264
- REDONDO-GÓMEZ, S.; MATEOS-NARANJO, E.; WHARMBY, C.; LUQUE, C.J.; CASTILLO, J.M.; LUQUE, T.; MOHAMED, M.F.; DAVY, A.J. y FIGUEROA, M.E., 2007. «Bracteoles affect germination and seedling establishment in a Mediterranean population of *Atriplex portulacoides*». *Aquatic botany*, 86, 93-96.
- ROBLES, A.B.; ALLEGRETTI, L.I. y PASSERA, C.B., 2002. «*Coronilla juncea* is both a nutritive fodder shrub and useful in the rehabilitation of abandoned Mediterranean marginal farmland». *Journal of Arid Environments*, 50, 381-392.
- RUBIO-CASAL, A.E.; CASTILLO, J.M.; LUQUE, C.J. y FIGUEROA, M. E., 2003. «Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans». *Journal of Arid Environments*, 53, 145-154.
- SONG, J.; FENG, G.; TIAN, C.H. y ZHANG, F., 2005. «Strategies for Adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a Saline environment during seed-germination stage». *Annals of Botany*, 96, 399-405
- STANDLEY, P.C., 1916. *North American flora. Chenopodiales. Chenopodiaceae*. Botanical Garden, Vol. 21, part I. 72 pp. New York, USA.
- STIDHAM, N.D.; AHRING, R. M.; POWELL, J. y CLAYPOOL, P.L., 1980. «Chemical scarification, moist prechilling, and Thio-urea effects on germination of 18 shrub Species». *Journal of Range Management*, 32(2), 115-118.
- TOBE, K.; LI, K. y OMASA, K., 2000. «Effects of sodium chloride on seed germination and growth of two Chinese desert shrubs, *Haloxylon ammodendron* and *H. persicum* (Chenopodiaceae)». *Australian Journal of Botany*, 48, 445-460
- UCHIYAMA, Y., 1987. «Salt tolerance of *Atriplex nummularia*». *Technical Bulletin of the tropical Agriculture Research Center*, 22, 1-69.
- UNGAR, I. A., 1962. «Influence of Salinity on Seed Germination in Succulent Halophytes». *Ecology*, 43(4), 763-764.
- 1978. «Halophyte seed germination». *Botanical Review*, 44: 233-264.
- 1991. *Ecophysiology of vascular halophytes*. CRV Press, Boca Raton, 209 pp. Florida (USA).
- 1995. «Seed germination and seed-bank ecology in halophytes». En: *Seed development and germination*, 599-628. Eds. J. Kigel, G. Galili y M. Dekker. New York (USA).
- 1996. «Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae)». *American Journal of Botany*, 83, 604-607.
- WASEL, Y., 1972. *Biology of halophytes*. Academic Press, 395 pp. New York (USA).
- WERNER, J.E. y FINKELSTEIN, R.R., 1995. «*Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress». *Physiologia Plantarum*, 93, 659-666.
- ZAR, J.H. *Bioestatical analysis* (4<sup>th</sup> ed.). Prentice Hall, 663 pp. New Jersey (USA).



# Plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM nativas del monte árido argentino.

## Adaptaciones y potencial biológico

CARLOS PASSERA,  
BRUNO CAVAGNARO  
y CARMEN SARTOR\*

### Resumen

El presente trabajo describe las características ecofisiológicas de los principales exponentes vegetales con tipo fotosintético C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM presentes en la Provincia Fitogeográfica del Monte en la zona árida y semiárida de Argentina. La importancia relativa de las Cactáceas (CAM) analizada como especie forrajera o como de uso antrópico es baja, por lo que solamente se hace referencia a los géneros presentes. Dentro de las especies C<sub>3</sub> se ha seleccionado al algarrobo (*Prosopis flexuosa*) que constituye una especie emblemática del árido argentino, principalmente por el amplio uso que los pobladores hacen de él. La zampa (*Atriplex lampa*) fue seleccionada entre las especies C<sub>4</sub> ya que es una de las principales especies forrajeras que además presenta características muy especiales respecto de sus adaptaciones al desierto. En ambas especies se analiza la respuesta de la germinación, el crecimiento o del estado hídrico cuando se somete a diferentes niveles de estrés hídrico o salino.

### Summary

The present work describes the ecophysiological characteristics of the main vegetal exponents with photosynthetic type C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and CAM present in the phytogeographic province of Monte in the arid and semi-arid zone of Argentina. The relative importance of cacti (CAM) analyzed as forage species or as human use is low. The C<sub>3</sub> species selected is the «algarrobo» (*Prosopis flexuosa*) that constitutes an emblematic species of the arid argentinean zone, mainly by the wide use that the settlers do of him. The C<sub>4</sub> species selected is the «zampa» (*Atriplex lampa*) which is important for feeding domestic animals, in addition zampa present a very special characteristics respect to their adaptations to the desert. In both selected species were tested the response to water potential, temperature and salinity on the germination processes is analyzed, growth and hydric status were also studied when plants were under different levels to water potential or saline stress.

\* Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento Ciencia Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. Almirante Brown 500 (M5528AHB) Lujan, Mendoza. Argentina

### Introducción

Los vegetales presentes en la Provincia Fitogeográfica del Monte (de aquí en más *Monte*) en Argentina, poseen gran diversidad de estrategias fisiológicas que han permitido su adaptación a las extremas y variables condiciones ambientales del lugar. Esta amplitud se debe fundamentalmente a que el *Monte* se extiende latitudinalmente desde los 25° a los 44° Lat sur y desde los 2.500 metros de altitud en la cordillera de Los Andes hasta la costa atlántica de la provincia del Chubut (Figura 1).

El Monte constituye un amplio territorio de 460.000 km<sup>2</sup> que incluye 11 provincias argentinas, en todo este territorio las lluvias son siempre escasas y estivales (entre 80 a 350 mm anuales) y temperatura media anual entre 13 y 17 °C. Los habitantes del lugar se dedican a la ganadería extensiva que es una de las pocas actividades económicas posibles, pero que posee poca productividad y en consecuencia determina economías de subsistencia.

La vegetación predominante es el matorral o la estepa arbustiva xerofítica, psamofítica o halofítica. Desde el punto de vista florístico la Provincia del Monte se caracteriza por la presencia casi constante de especies del género *Larrea* (las jarillas) *Atriplex* y *Prosopis*, estos últimos se encuentran formando bosques marginales. La comunidad clímax es el jarillal. Se trata de una asociación de jarillas (*Larrea divaricata*, *L. nitida*, *L. cuneifolia*), ala de loro (*Monttea aphylla*) y monte negro (*Boungavillea spinosa*), arbustos de aproximadamente 2 m de altura. Otros arbustos abundantes son la pichana (*Cassia aphylla*), la brea (*Cercidium praecox*), y el alpataco (*Prosopis alpataco*).

Entre los factores que fisiológicamente imponen estrés se puede señalar la baja disponibilidad hídrica como el factor ambiental más limitante, debido funda-

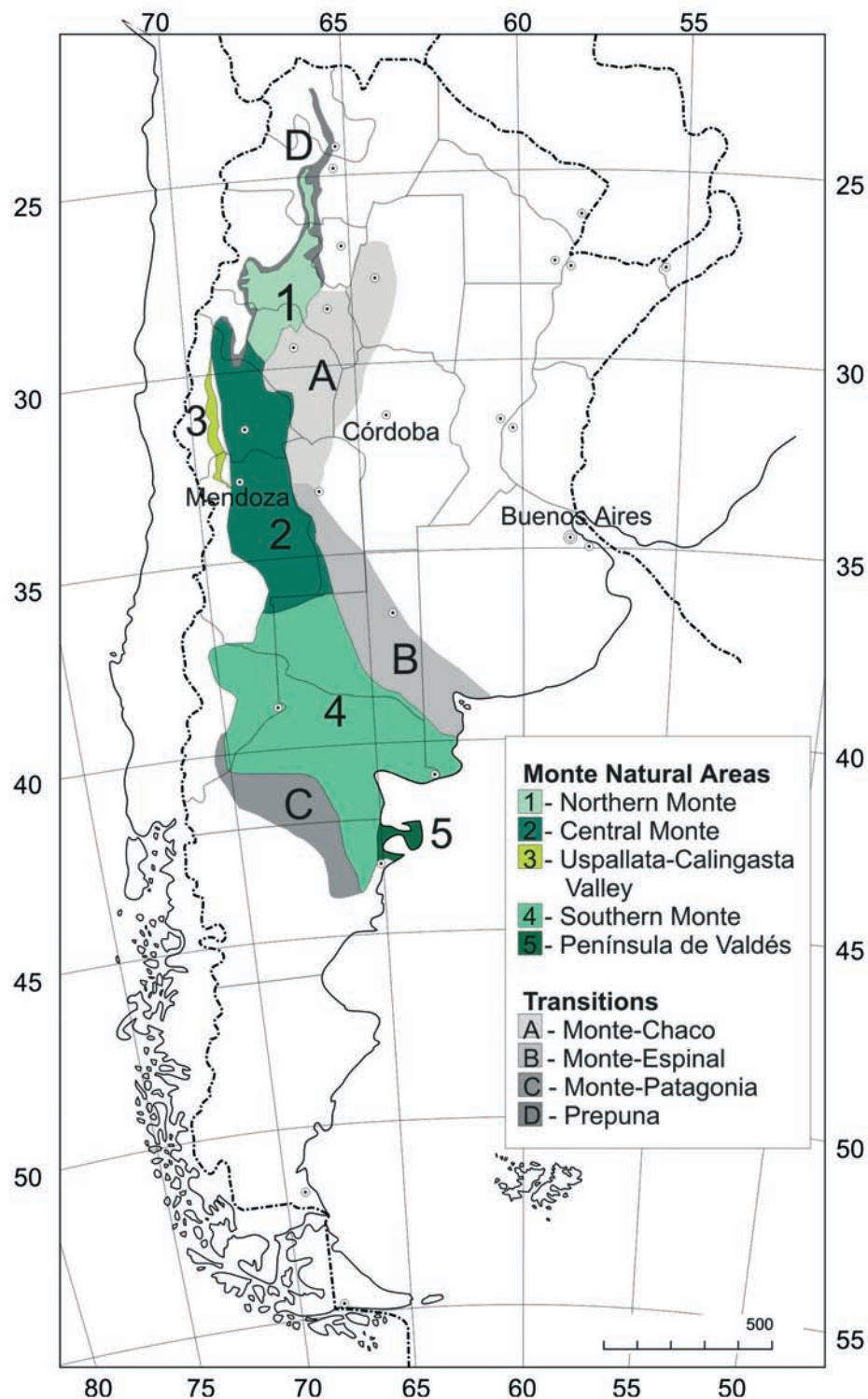


FIGURA 1. Ubicación geográfica de la Provincia Fitogeográfica del Monte.

mentalmente a la baja pluviosidad y la alta evapotranspiración. La salinidad, las diferentes texturas de suelos y las temperaturas extremas contribuyen también a crear condiciones de estrés en gran parte del territorio.

Frente a esta diversidad ambiental las plantas presentan una amplia variedad de bioformas y diferentes adaptaciones morfo-fisiológicas que involucran especies C3, C4 y CAM.

Si bien no se puede establecer un área geográfica específica para ubicar a cada tipo fotosintético, es decir que suele encontrarse en el mismo sitio conviviendo especies  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM, trabajos realizados en gramíneas indican que en la zona del llano de Mendoza, donde las temperaturas medias son más elevadas, se encuentran mayormente gramíneas del tipo  $C_4$  en tanto que localizadas en valles de altura donde el déficit hídrico no es tan grande, las gramíneas presentes son mayoritariamente  $C_3$  (Cavagnaro 1988).

Sin duda el género más importante en los desiertos de Argentina es el que incluye a los Algarrobos, leguminosas que se presentan con un gran número de especies dentro de las que existen varias especies arbóreas como *Prosopis flexuosa* (Figura 2), *P. Chilensis*, *P. nigra* y *P. alba*, en todos los casos  $C_3$ . Otro grupo de especies  $C_3$  lo constituyen las Jarillas, de la familia Zigoofiláceas, arbustos que se extienden a lo largo de todo el Monte y son las que fisonómicamente le otorgan el carácter de matorral localmente llamado Arbustal o Monte.



FIGURA 2. *Prosopis flexuosa* (algarrobo).

Otro grupo de especies arbustivas de amplia distribución en el Monte y de gran importancia como forrajera (Passera y Borsetto 1989) son los *Atriplex*, pertenecientes a la familia de las Quenopodiáceas, llamadas comunmente zampas o cachiuyos. Las especies con mayor distribución geográfica son *Atriplex lampa* (Figura 3), *A. undulata*, *A. crenatifolia*, *A. cordobensis* entre otras. Si bien todos estos arbustos de Argentina son  $C_4$ , este género presenta características muy especiales respecto de su tipo fotosintético pues incluye también especies  $C_3$ . Conocido son los trabajos realizados con *Atriplex rosea*  $C_4$  y *A. triangularis*  $C_3$  y los



FIGURA 3. *Atriplex lampa* (zampa).

híbridos logrados de su cruzamiento interespecífico logrando descendencia con características intermedias entre  $C_3$  y  $C_4$  (Osmond *et al.*, 1980).

Las especies CAM son representadas en el Monte por las cactáceas que en gran número y variedad también se distribuyen por toda esta zona árida. En la zona norte de Catamarca y Salta, encontramos especies columnares que abundan en la Puna pero que también aparecen acompañando los jarillares del Monte como *Trichocereus pasacana*, *Cereus aethiops*, *Echinopsis* sp. y *Lobivia formosa*. En la provincia de Mendoza las especies más comunes son *Opuntia sulphurea* y *Trichocereus candicans*. Si bien estas plantas presentan las adaptaciones más extremas a la xericidad, con altas eficiencias en el uso de agua, ausencia de hojas y epidermis con potente cutícula impermeable, desde el punto de vista antrópico no tienen mayor importancia, debido a su escaso crecimiento y su baja palatabilidad.

A continuación se exponen una serie de características de algunos géneros que nos parecen los más importantes dentro de las  $C_3$  y  $C_4$ .

### Algarrobos ( $C_3$ )

Como ya hemos señalado, los algarrobos son uno de los pocos vegetales que llegan a tener porte arbóreo, por esta razón son muy apreciados por los lugareños ya que aportan sombra en los tórridos veranos, leña de alta calidad, madera de construcción y sus hojas y legumbres (algarrobos) son muy apetecidas por el ganado. Con la harina de las algarrobos también se elabora el

«patay» que es una especie de tarta dulce para el consumo humano con gran aporte de energía.

Los algarrobos son especies en su gran mayoría freatófitas, colonizadoras o invasoras que resisten la salinidad, alcalinidad y el frío (Roig, 1993).

El hábito de enraizamiento se caracteriza por un gran crecimiento radicular aun cuando el vástago tiene un escaso desarrollo. Esto afirma la condición freatófita o de freatófita facultativa de los *Prosopis*, lo cual permite el desarrollo de bosques abiertos aun en lugares donde el balance hídrico del clima no lo permitiría (González Rebolgar, com. per.).

Una característica muy particular es que el género *Prosopis* presenta ejemplos de altas tasas fotosintéticas para los ambientes que habita, se han determinado valores de Intercambio Neto de Carbono (INC) de hasta 30 y 40 mg CO<sub>2</sub> dm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, que son superiores a los de cualquier otro vegetal del desierto y semejante al de especies del tipo fotosintético C<sub>4</sub>.

Trabajos realizados en *Prosopis glandulosa* indican que en ellos no existe saturación lumínica hasta valores de irradiancia de 1780 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, lo que indica su acentuada condición heliófita.

La alta eficiencia fotosintética también se basa en un ajustado balance hídrico, aspecto que se evidencia

por el mantenimiento de altos valores de turgencia aun luego de prolongados períodos de sequía (Cavagnaro y Passera 1993a). Para ello realizan ajuste osmótico (Nilsen *et al.* 1983) y en condiciones de extremas sequías solamente hacen fotosíntesis en tempranas horas de la mañana cuando la demanda atmosférica de agua aún no es elevada.

Otro aspecto importante de destacar sobre la fisiología de *Prosopis* es el transporte de fotoasimilados. Estos vegetales priorizan sus funciones reproductivas pero en momentos que no existe floración ni fructificación, almacenan sus reservas en troncos y raíces y de esta manera mantienen sus estructuras vitales.

La germinación es una etapa delicada en la vida de todos los vegetales, la cual está afectada por la temperatura y la disponibilidad de agua. En este sentido, Cony y Trione (1996) trabajando con semillas de *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* determinaron que las temperaturas óptimas de germinación eran de 20 y 25 °C y 25 a 40 °C para cada una de las especies respectivamente (Figura 4). Estos autores, también observaron que las semillas de estas especies germinan aun con potenciales agua de -2,20 MPa, siendo *P. flexuosa* la especie más resistente a las condiciones de estrés hídrico (Cony y Trione 1998) (Figura 5).

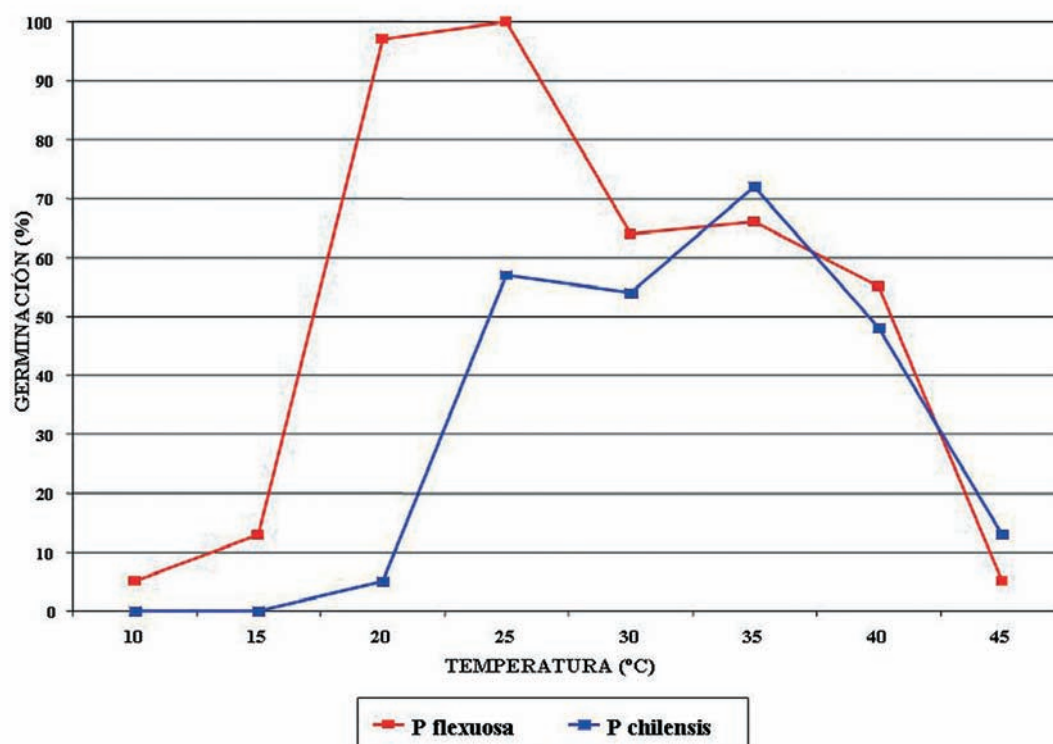


FIGURA 4. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* en función de la temperatura (Cony & Trione, 1996).

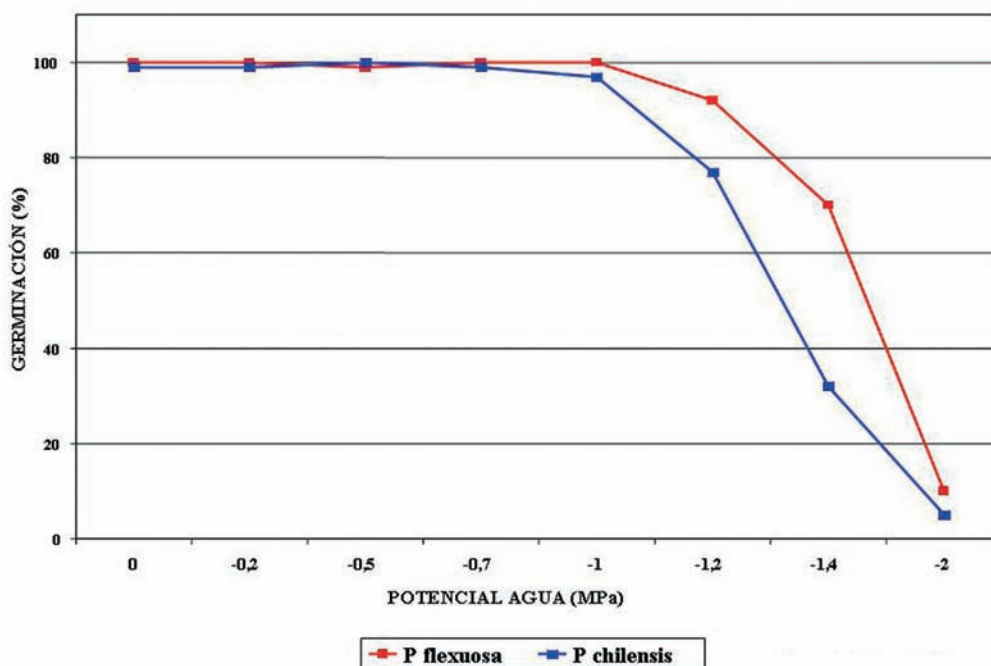


FIGURA 5. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* en función del potencial agua (Cony & Trione, 1998).

Por otro lado, Villagra (1998) midió la tolerancia a la salinidad y a la hipoxia en la germinación y crecimiento de *Prosopis alpataco* y *P. argentina*. Estas dos especies son arbustos que crecen en la misma zona (Lavalle, Mendoza) pero ocupan nichos diferentes, mientras el primero ocupa terrenos bajos de suelos arcillosos y

periódicamente anegados el segundo se ubica en médanos que nunca son inundados y de textura arenosa. El ensayo encontró que *P. alpataco* presenta una mayor resistencia a la salinidad en la germinación (Figura 6) y valores superiores de biomasa y crecimiento en condiciones de anegamiento. (Tabla 1). Ambos resultados in-

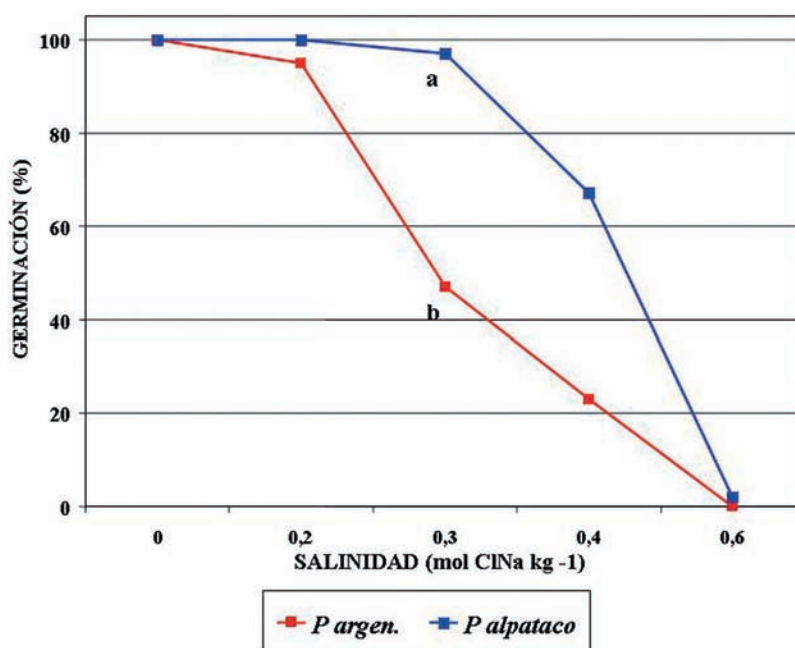


FIGURA 6. Efecto de la salinidad sobre la germinación de *Prosopis argentina* y *P. alpataco* (Villagra, 1998).

TABLA 1

Efecto del anegamiento en el crecimiento de *Prosopis argentina* y *P. alpataco* (Villagra, 1998)

Parámetros	<i>Prosopis argentina</i>		<i>Prosopis alpataco</i>	
	Testigo	Anegado	Testigo	Anegado
Biomasa total (mg)	328,4 b	313,9 b	718,9 a	1.140,1 a
Crecimiento (cm)	132,1 b	135,3 b	181,1 b	240,6 a

dicen que esta especie tiene una fuerte adaptación al hábitat que ocupa, logrando por esta razón una fuerte presencia y caracterizando fisonómicamente los lugares donde habita.

Vilela y Ravetta (2000) estudiaron el efecto de la irradiancia en la producción de biomasa de cuatro especies de algarrobos. En todos los casos se determinó que la producción de materia seca aumenta a medida que aumenta la disponibilidad de luz (Figura 7). Esto se debe seguramente al hecho que no existe saturación lumínica hasta irradiancias de  $1.780 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en tanto que la generalidad de las  $C_3$  saturan a valores de entre los 700 a los  $1.000 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La alta necesidad de luz fue verificada en ensayos realiza-

dos con *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* en cámaras de crecimiento, donde las plantas se ahilaron y etiolaron cuando crecían con irradiancias de  $200 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Cavagnaro, com. per.)

El INC tiene una alta correlación con la conductancia estomática (CE) a lo largo de un día. La Figura 8 muestra los valores de ambos parámetros medidos en *Prosopis glandulosa* cuando crece en suelos con alto déficit hídrico (Sosebee y Wan, 1987), a las 14 horas se verifica una caída en la conductancia debida a un cierre estomático de medio día, causado seguramente por el desbalance producido por el alto estrés, estos datos sugieren que estas plantas realizan INC en la mañana temprano cuando el balance hídrico aún es favorable.

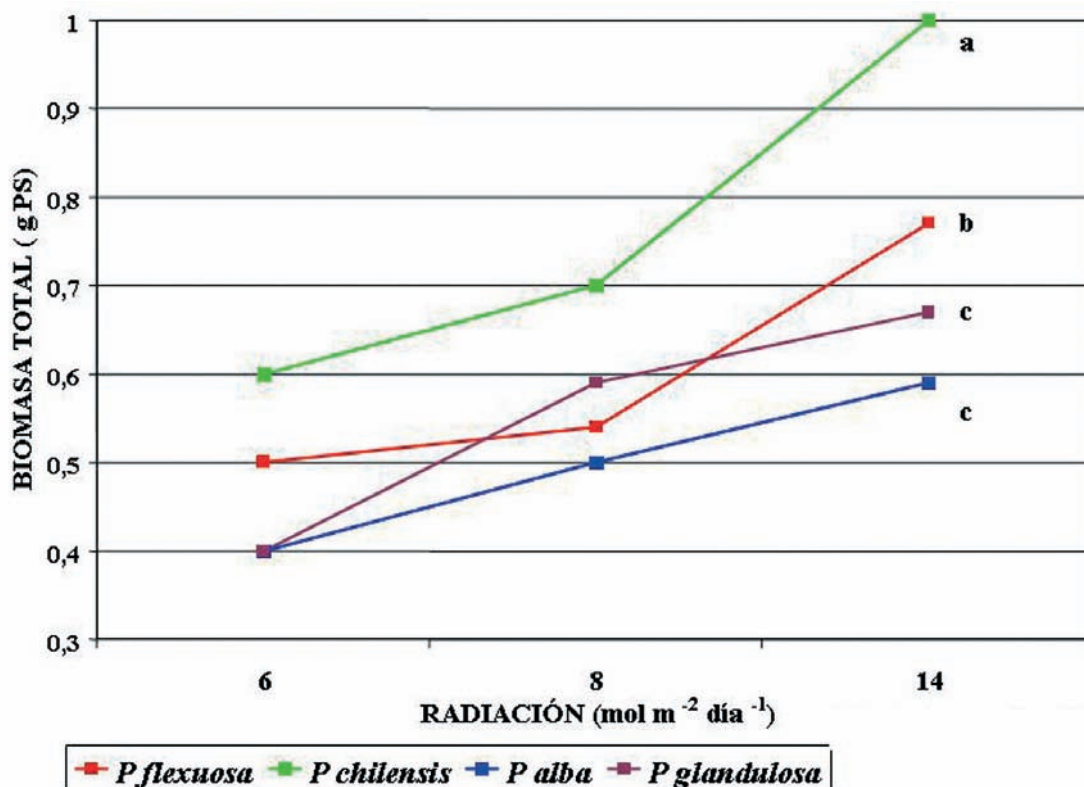


FIGURA 7. Peso seco total de plantas de 60 días de edad de *Prosopis flexuosa*; *P. alba*; *P. chilensis* y *P. glandulosa* (Vilella & Ravetta, 2000).

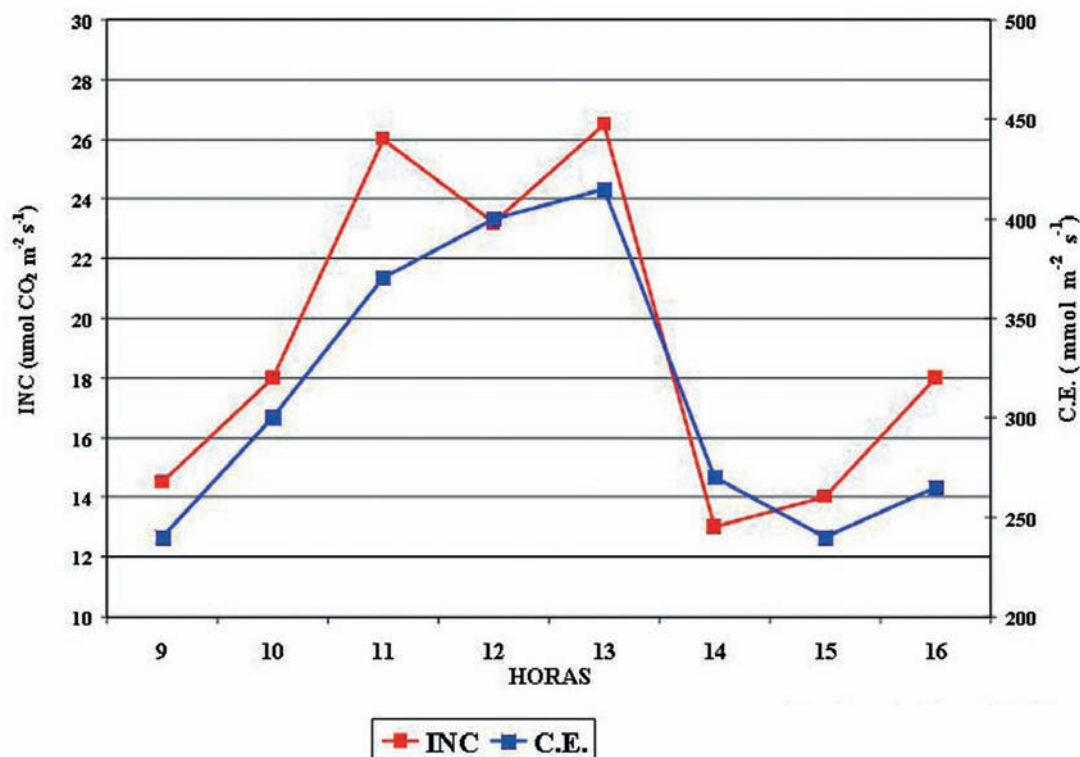


FIGURA 8. Fotosíntesis neta (INC) y conductancia estomática (C.E.) de *Prosopis glandulosa* en condiciones de buena disponibilidad hídrica (Sosebee & Wan, 1987).

Cavagnaro y Passera (1993a), trabajando en una comunidad de *Prosopis flexuosa*, encontraron que a lo largo de todo un ciclo vegetativo los algarrobos mantenían potenciales agua muy superiores a los determinados en un arbusto  $C_4$  (*Atriplex lampa*) que vegetaba en el mismo ambiente (Tabla 2), e incluso a las gramíneas presentes (datos no mostrados).

TABLA 2

Potenciales agua determinados en pre-amanecer de *Prosopis flexuosa* y *Atriplex lampa*. Ñacuñán (Cavagnaro y Passera, 1993a)

Fechas	Potencial Agua en MPa	
	<i>Prosopis flexuosa</i>	<i>Atriplex lampa</i>
17 /XI/ 1987	-0,77	-2,35
12 /XII/ 1987	-1,12	-5,25
8 /I/ 1988	-1,22	-1,86
4 /II/ 1988	-1,33	-4,76
6 /IV/ 1988	-1,24	-4,59

Los valores de potencial agua de preamanecer indican que estos árboles mantienen una gran independencia hídrica, respecto de las precipitaciones, de esta

manera mantienen altos potenciales de turgencia +1,82 MPa, lo que les permite mantener el crecimiento (Figura 9). Este comportamiento confirma la condición freatófita de esta especie, pero a su vez despierta muchas incógnitas, debido a que en el lugar donde se realizó el estudio (Ñacuñán, Mendoza), el agua freática (conocida) más cercana a la superficie, está a una profundidad de alrededor de 70 metros. Si realmente *Prosopis flexuosa* en Ñacuñán, depende de esta agua, tiene entonces que desarrollar grandes succiones para poder acceder a ella.

### Zampas (C4)

Dentro de los arbustos con tipo fotosintético  $C_4$  se destacan los del género *Atriplex* y específicamente *Atriplex lampa* Gill. Ex Moq. (Chenopodiaceae), zampa (Morello, 1958; Mulgura, 1981) que ha sido motivo de numerosos estudios por nuestra parte debido fundamentalmente a su amplia distribución y su importancia como especie forrajera. Esta especie es un arbusto siempreverde y sus partes forrajeables poseen un alto contenido de proteína, (Wainstein y Gonzalez, 1971; Silva Colomer y Passera, 1990). Si bien las gramíneas

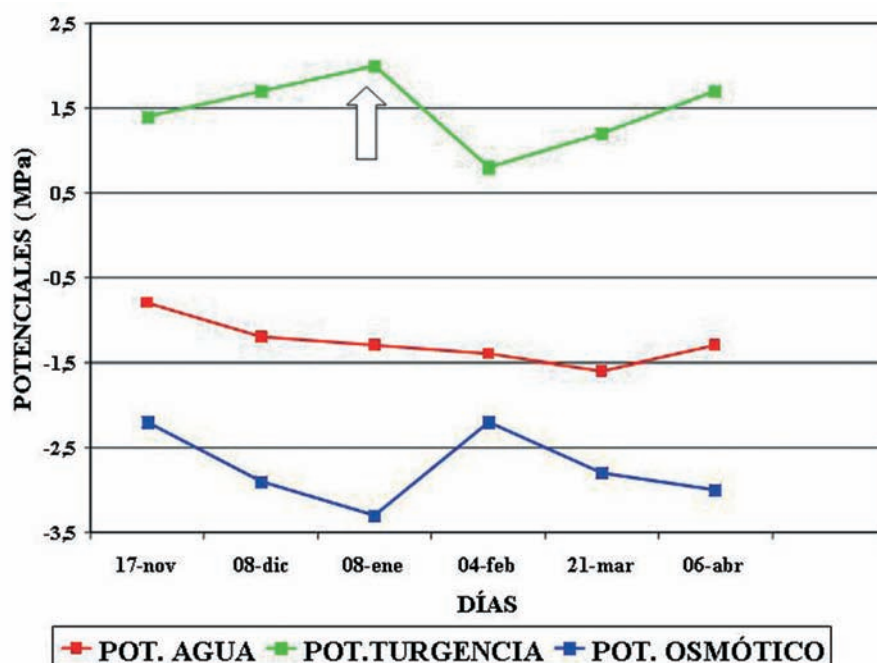


FIGURA 9. Potencial agua, potencial osmótico y potencial de turgencia en *Prosopis flexuosa* medidos antes del amanecer, en Ñacuñán (Cavagnaro & Passera, 1993).

constituyen un importante aporte forrajero (Silva Colomer *et al.*, 1989, Guevara *et al.*, 1997), *A. lampa* y otros arbustos ofrecen forraje verde durante el invierno, pues mantiene el crecimiento de sus brotes (Passera y Borsetto 1989; Cavagnaro y Passera 1993b), momento en que la oferta por parte de las herbáceas es escasa. Al igual que otros arbustos, zampa, es de gran importancia en la recuperación de la vegetación y en mantener la estabilidad de los suelos (Le Houérou, 1991, 1992; Allegretti y Passera, 1997), a pesar que Passera *et al.* (2007) demostraron que es una especie muy afectada por los incendios.

Caraciolo Maia *et al.* (2002) a fin de determinar el efecto de la salinidad en el crecimiento de zampa, aplicó a plántulas seis riegos cada cinco días, con soluciones

de Murashige Skoog (MS) (1962), y diferentes concentraciones de cloruro de sodio (200, 400, 600 y 800 mM de NaCl) y sin NaCl. Midieron: altura de plantas a partir del cuello y peso seco del vástago a los 7; 14; 21 y 28 días. Del ensayo se concluye que los niveles de cloruro de sodio empleados reducen el crecimiento de *Atriplex lampa* respecto del testigo, acentuándose este efecto a medida que aumentan las concentraciones salinas y los días bajo tratamiento (Tabla 3). El crecimiento medido a través de la materia seca aérea producida también disminuye a medida que aumenta la salinidad del suelo (Tabla 4). Estos resultados coinciden con los encontrados para la misma especie por Passera y Allegretti (1996) y en otras especies del mismo género por Williams (1972) y Osmond *et al.* (1980).

TABLA 3

Altura media (cm) de plantas de *Atriplex lampa* regadas con soluciones de diferente concentración salina

Tratamientos	Altura media del vástago (cm)			
	7 días	14 días	21 días	28 días
Sin NaCl	4,60 a	10,4 a	17,00 a	21,20 a
200 mM NaCl	3,30 a	7,30 a	14,30 a b	16,20 a b
400 mM NaCl	3,22 a	7,60 a	12,80 a b c	14,70 b c
600 mM NaCl	3,80 a	7,50 a	10,40 b c	11,80 b c
800 mM NaCl	3,00 a	6,60 a	8,60 c	9,60 c

En cada columna, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey).

TABLA 4

**Peso seco medio de plantas (g) de *Atriplex lampa* regadas con soluciones de diferente concentración salina en diferentes momentos del ensayo**

Tratamientos	Peso medio del vástago (g)			
	7 días	14 días	21 días	28 días
Sin NaCl	11,1 a	16,9 a	23,5 a	27,7 a
200 mM NaCl	10,6 a	14,6 a	21,6 ab	23,5 b
400 mM NaCl	11,3 a	15,7 a	20,9 ab	22,8 b
600 mM NaCl	11,1 a	14,8 a	17,7 b	19,1 c
800 mM NaCl	12,0 a	16,4 a	19,2 b	19,4 c

En cada columna, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey)

En otro ensayo sobre el comportamiento de plántulas de zampa sometidas a sequía Trione y Passera, (1993) y posteriormente Passera y Allegretti (1996), estudiaron el efecto del estrés hídrico a lo largo de un año. El ensayo se realizó en condiciones semicontroladas de invernáculo en plantas localizadas en macetas de 2,5 l de capacidad y rellenas con 3,5 kg de suelo franco. Las plántulas fueron regadas a capacidad de maceta hasta los 90 días después de la siembra y desde los 125 días se aplicaron dos tratamientos de disponibilidad hídrica: Testigo: con riegos hasta capacidad de maceta (potencial agua = -0,003 MPa) cada vez que el agua disponible para la planta disminuía por debajo del 50 % (potencial agua = -0,05 Mpa., 14 riegos durante el ensayo); y Estrés: con riegos cuando el agua disponible disminuía por debajo del 10 % (potencial agua = -5,0 MPa., 7 riegos durante el ensayo). Se seleccionaron estos umbrales pues en ensayos anteriores se había determinado que zampa no manifestaba estrés aun cuando el potencial agua fuera de -1,5 MPa. La cantidad de agua a agregar en cada riego se calculaba por el peso de la maceta. En cada muestreo, que se realizó a los 90, 125, 150, 195, 265 y 350 días después de la siembra (DDS) y en seis plantas, se determinó el potencial agua de preamanecer (Scholander *et al.*, 1965), potencial osmótico (por psicrometría en Wescor C-52/H 33-T), altura total del vástago, número de nudos, diámetro de copa y del vástago, peso seco del vástago, de la raíz y área foliar. Simultáneamente y en plantas no sacrificadas se determinó por pesadas seriadas la intensidad transpiratoria y con los datos de materia seca producida se calculó la eficiencia en el uso de agua expresada como gramo de materia seca produ-

cido por kilo de agua transpirada y la relación entre los pesos secos de raíz respecto del vástago.

Se analizaron diferentes parámetros del crecimiento determinando una reducción del 30 % en la productividad cuando había estrés, además el potencial agua determinado en preamanecer bajó a valores cercanos a los -6 MPa sin causar la muerte de las plantas.

La Figura 10 muestra la acumulación de materia seca a lo largo de los seis muestreos. Las diferencias en la producción aparecen recién a partir de los 265 días y se hace más evidente a los 350.

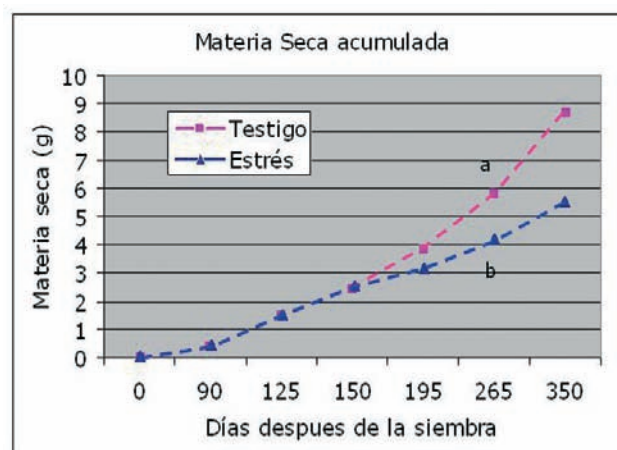


FIGURA 10. Productividad de materia seca de *Atriplex lampa* acumulada bajo dos niveles de riego.

Al finalizar el ensayo (350 días después de la siembra) se lograron los siguientes resultados en número de nudos, altura del vástago, diámetro de la copa, diámetro del vástago y relación entre peso seco de la raíz *versus* del vástago: (Tabla 5).

TABLA 5

Número de nudos, altura del vástago, diámetro de la copa y del vástago y relación entre peso seco de la raíz/vástago, a los 350 DDS

Características a los 350 DDS	Número de nudos	
	Testigo	Estrés
Número de Nudos	32,0 a	30,8 a
Altura del Vástago (cm)	45,7 a	38,8 b
Diámetro de Copa (cm)	13,3 a	9,4 b
Diámetro del Vástago (mm)	3,3 a	2,9 b
Peso seco Raíz/Vástago	0,23 b	0,38 a

En cada fila, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey)

La tabla anterior muestra que el estrés no redujo el número de nudos pero si redujo con diferencias significativas la altura de las plantas, el diámetro de copa y el diámetro del vástago. Una mención especial merece la relación entre el peso seco raíz/vástago que señala mayor valor en el tratamiento estrés, lo cual indica que las plantas en esta condición invirtieron mayor proporción de fotosintatos en raíz.

En la Tabla 6 se muestran los valores de área foliar durante el ensayo. Puede observarse que la magnitud foliar disminuye significativamente en el tratamiento con estrés a partir de los 195 DDS y se mantiene así hasta el final del ensayo.

TABLA 6

Área foliar ( $\text{cm}^2$ ) de plántulas sometidas a dos niveles de disponibilidad hídrica durante 350 DDS

DDS	Área Foliar ( $\text{cm}^2$ )	
	Testigo	Estrés
90	23	—
125	71	—
150	113 a	109 a
195	169 a	129 b
265	220 a	142 b
350	558 a	268 b

En cada fecha (fila), las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey).

La intensidad transpiratoria no es diferente entre los tratamientos con y sin estrés después de los 150 DDS y la eficiencia en el uso de agua disminuye desde 4,4 a 0,2 a medida que la plantas crecen más (Tabla 7).

TABLA 7

Intensidad transpiratoria ( $\text{ml agua}/\text{dm}^2$  área foliar  $\times$  día) y Eficiencia en el uso de agua EUA ( $\text{g}$  de materia seca producida por  $\text{kg}$  de agua transpirada)

DDS	Testigo		Estrés	
	Transpiración ( $\text{ml}/\text{dm}^2.\text{día}$ )	EUA ( $\text{g}/\text{kg}$ )	Transpiración ( $\text{ml}/\text{dm}^2.\text{día}$ )	EUA ( $\text{g}/\text{kg}$ )
90	3,5 a	—	0,0 b	—
125	10,1 a	4,4 a	0,0 b	0,0 b
150	13,4 a	2,6 a	14,7 a	2,6 a
195	15,4 a	1,3 a	13,0 a	1,0 b
265	12,7 a	0,9 a	12,1 a	0,8 a
350	28,7 a	0,2 a	25,7 a	0,2 a

En cada fecha (fila), las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey).

Los valores medios de potencial agua al preamanecer y potencial de turgencia se muestran en la Tabla 8, tal como era de suponer ambos valores son más negativos en los tratamientos de estrés. Se han determinado valores muy extremos de potencial agua llegando a  $-5,7$  MPa sin que los mismos hayan producido la muerte de las plantas. Los valores de potencial de turgencia que se pueden calcular por diferencia entre potencial osmótico y agua, nos indican que en ningún momento aparecen valores negativos. La constante disminución de los valores de potencial osmótico durante el ensayo y el mantenimiento de la turgencia indican que esta especie realiza ajuste osmótico. Este proceso es de vital importancia para mantener turgencia (Oosterhuis y Wullshleger, 1987) y continuar con actividad fisiológica y el crecimiento aún bajo fuerte estrés (Osmond *et al.*, 1980).

TABLA 8

Valores medios de potencial agua al preamanecer y potencial osmótico (MPa) durante los muestreos

DDS	Potencial Agua (MPa)		Potencial Osmótico (MPa)	
	Testigo	Estrés	Testigo	Estrés
125	-1,60 a	-1,60 a	-2,69 a	-2,69 a
150	-2,27 a	-5,63 b	-3,42 a	-6,27 b
195	-3,45 a	-5,71 b	-4,68 a	-6,72 b
265	-2,74 a	-3,33 b	-6,43 a	-7,02 b
350	-1,98 a	-4,32 b	-7,03 a	-8,79 b

En cada tipo de potencial, las medias con igual letra expresan que no hay diferencias significativas para  $p = 0,05$  (según el test de Tukey).

## Algunas consideraciones finales

Las plantas nativas del Monte árido argentino presentan características fisiológicas que les permiten soportar las extremas condiciones de aridez que el ambiente les impone. Más allá del tipo fotosintético que se trate hemos analizado especies  $C_3$  y  $C_4$  (*Prosopis* spp y *Atriplex* spp) y en ambas aparecen características especiales que aseguran el éxito reproductivo y por lo tanto su persistencia en el desierto.

Primeramente debemos destacar la capacidad de germinar y establecerse aun bajo condiciones de extremo déficit hídrico, esta característica explica su presencia principalmente en regiones áridas y semiáridas del mundo.

En el caso de *Prosopis* se ha demostrado que mantienen crecimiento en condiciones adversas, tal como lo hace *Atriplex*, esta característica le otorga ventajas competitivas incluso frente a plantas  $C_4$ , que en general se acepta como las mejores adaptadas a ambientes tropicales y secos, además pueden competir por agua superficial o usar la de freáticas incluso de napas profundas.

Por último podemos mencionar que todas estas características hacen que las plantas del género *Prosopis* sean de alta importancia en los ambientes áridos y semiáridos del mundo, aportando sombra, madera, leña, alimento humano y forraje.

En el caso de *Atriplex lampa* quizá un mecanismo que le otorga resistencia a la sequía es la capacidad de reducir el área foliar y una partición de asimilados que favorece a las raíces y por tanto la supervivencial (Wilcox-Lee, 1987; Turner y Begg, 1978).

Los datos obtenidos indican que *Atriplex lampa* mantiene el crecimiento aún cuando el potencial agua determinado al premanecer arrojó valores de -5,7 MPa. A modo comparativo es interesante indicar que en caso de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cesa el crecimiento cuando su potencial agua baja de -1,5 MPa (Hall *et al.*, 1988).

Finalmente queremos decir que la capacidad de lograr potenciales agua tan negativos puede ser debido a los altos contenidos proteicos asociados a osmolitos compatibles como son la prolina y betaina encontrados luego de soportar déficit hídrico (Trione y Passera, 1993) porque tal como lo indica Gates (1968), algunas plantas mantienen sus procesos vitales aun cuando son expuestas a severas sequías.

## Referencias bibliográficas

- ALLEGRETTI, L.I.; PASSERA, C.B. y ROBLES, A.B., 1997. «Short and long-term effects of shrub management on vegetation in the Monte, Argentina». *Journal of Arid Environments*, 35: 685-693.
- CARACIOLO MAIA, L.M.; PASSERA, C.B.; ALLEGRETTI, L.I. y ROBLES CRUZ, A.B., 2002. «Efecto de diferentes niveles de salinidad sobre el crecimiento de *Atriplex lampa*». *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, Univ.Nac Cuyo. 34(2), 101-106.
- CAVAGNARO, J.B., 1988. «Distribution of  $C_3$  and  $C_4$ , grasses at different altitudes in a temperate arid region of Argentina». *Oecología* 76, 273-277.
- CAVAGNARO, J.B. y PASSERA, C.B., 1993a. «Relaciones hídricas de *Prosopis flexuosa*, («Algarrobo dulce») en el Monte, Argentina.73-78». En: *Conservación y mejoramiento de especies del género Prosopis*. Eds. F.Roig, S.Trione y J.B. Cavnagaro. Contribuciones Mendocinas a la Quinta Reunión Regional para América Latina y El Caribe del CIID.
- 1993b. «Water utilization by shrub and grasses in the Monte ecosystems, Argentina». En *Proceedings IV<sup>th</sup> International Rangeland Congress*. 255-257. Montpellier, France.
- CONY, M.A. y TRIONE, S.O., 1996. «Germination with respect to temperature of two Argentinian *Prosopis* species». *Journal of Arid Environments* 33: 225-236.
- 1998. «Inter- and intraspecific variability in *Prosopis flexuosa* and *P. chilensis*; seed germination under salt and moisture stress». *Journal of Arid Environments* 40: 307-317.
- GATES, C.T., 1968. «Water deficits and growth of herbaceous plants». En T.T. Kozlowski (ed.). *Water Deficits and Plant Growth*. Vol. II, 135-190. Academic Press, New York and London.
- GUEVARA, J.C.; CAVAGNARO, J.B.; ESTÉVEZ, O.R.; LE HOUREOU, H.N. y STASI, C.R., 1997. «Review. Productivity, management and development problems in the arid rangelands of the central Mendoza plains (Argentina)». *Journal of Arid Environment*, 35: 575-600.
- HALL, M.H.; SHEAFFER, C.C. y HEICHEL, G.H., 1988. «Partitioning and mobilization of photoassimilate in Alfalfa subjected to water deficits». *Crop Science* 28(6): 964-969.
- LE HOUREOU, H.N., 1991. «New, man-made agro-silvo-pastoral production systems for the isoclimatic mediterranean arid zone». *Proceedings IV<sup>th</sup> International Rangeland Congress*. Montpellier, France, 17 pp.
- 1992. «The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review». *Agroforestry Systems*, 18, 107-148.
- MORELLO, J., 1958. «La provincia fitogeográfica del Monte». *Opera Lilloana*, 2: 1-155.
- MULGURA, M.E., 1981. «Contribuciones al estudio del género *Atriplex* (Chenopodiaceae) en la Argentina, I». *Darwiniana*, 23(1), 119-150.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- NILSEN, E.T.; SHARIFI, M.R.; RUNDEL, P.W.; JARREL, W.M. y VIRGINIA, R.A., 1983. «Diurnal and seasonal water relations of the desert phreatophyte *Prosopis glandulosa* (Honey mesquite) in the sonoran desert of California». *Ecology* 64(6): 1381-1393.
- OOSTERHUIS, D.M. y WULLSHLEGER, S.D., 1987. «Osmotic adjustment in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves and

- roots in response to water stress». *Plant Physiology*, 84: 1154-1157.
- OSMOND, C.B.; BJORKMAN, O. y ANDERSON, D.J., 1980. *Physiological Process in Plant Ecology. Toward a synthesis with Atriplex*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 468 pp.
- PASSERA, C.B y BORSETTO, O., 1989. «Aspectos Ecológicos de *Atriplex lampa*. Investigaciones Agrarias». *Prod. Protec. Veget.* (España), 4(2): 179-198.
- PASSERA, C.B. y ALLEGRETTI, L.I., 1996. «Relaciones hídricas, productividad y partición de asimilados en plántulas de *Atriplex lampa* sometidas a estrés hídrico». En *Resúmenes XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. Mendoza, 20-22 Marzo de 1996. Pp 230-231.
- PASSERA, C.B.; ALLEGRETTI, L.I. y ROBLES, A.B., 2007. «Effect of non-prescribed fire on *Atriplex lampa* community, in the Guadal Plateau of Mendoza province, Argentina». *Arid Land Research and Management*. 21, 91-105.
- ROIG, F.A., 1993. «Informe Nacional para la selección de germoplasma en especies de *Prosopis* de la República Argentina. 73-78». En: *Conservación y mejoramiento de especies del género Prosopis*. Eds. F.Roig, S.Trione y J.B.Cavagnaro. Contribuciones Mendocinas a la Quinta Reunión Regional para América Latina y El Caribe del CIID.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, D.E. y HEMMINGSEN, E.A., 1965. «Sap pressure in vascular plants». *Science*, NY, 148: 339-346.
- SILVA COLOMER, J.; CAVAGNARO, J.B.; LEMES, L. y MEDERO, M., 1989. «Productivity and nutritive values in three ecotypes of *Trichloris crinita*, native forage grass of the arid zones of Argentina». Proc. XVI International Grassland Congress. Nice, France, 4-11 October 1989, pp. 815-816.
- SILVA COLOMER, J. y PASSERA, C.B., 1990. «The nutritional values of *Atriplex* spp as fodder for arid regions». *Journal of Arid Environments*, 19:289-295.
- SOSEBEE, R.E. y WAN, C., 1987. «Plant Ecophysiology: a case study of honey mesquite». Presented at the Symposium on Shrub Ecophysiology and Biotechnology.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E., 1998. *Plant Physiology*. 2º Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 792 pp.
- TRIONE, S.O. y PASSERA, C.B., 1993. «Growth and nitrogen status of *Atriplex lampa* seedlings under different water regimes». *Journal of Arid Environments*, 25:331-341.
- TURNER, N.C. y BEGG, J.E., 1978. «Responses of pasture plants to water deficit». In J.R. Wilson (ed). *Plant Relations in Pasture*. International Symposium on Plant Relations in Pasture. Brisbane, Australia, May 1976, p. 50-66. C.S.I.R.O., 425 pp.
- VILELA, A.E. y RAVETTA, D.A., 2000. «The effect of radiation on seedling growth and physiology in four species of *Prosopis* L. (Mimosaceae)». *Journal of Arid Environments* 44: 415-423.
- VILLAGRA, P.E., 1998. «Comparación del comportamiento fitosociológico y ecofisiológico de *Prosopis argentina* y *Prosopis alpataco* (Fabaceae, Mimosoideae)». Tesis doctoral presentada al PROBIOL-Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza Arg. 130 pp.
- WAINSTEIN, P. y GONZÁLEZ, S., 1971. «Valor nutritivo de plantas forrajeras del este de la provincia de Mendoza (Reserva Ecológica de Ñacuñán)». *Deserta* (Argentina), 2: 67-75.
- WILCOX-LEE, D., 1987. «Soil matric potential, plant water relations, and growth in *Asparagus*». *Hort Science*, 22 (1): 22-24.
- WILLIAMS, D.G., 1972. *Ecological studies on shrub-steppe of the western Riverina, New South Wales*. Ph D Thesis. Australian National University, Canberra.

# Establecimiento y desarrollo de *Atriplex halimus* L.: técnicas de implantación y efecto del pastoreo

JABIER RUIZ MIRAZO  
y ANA BELÉN ROBLES CRUZ\*

## Resumen

*Atriplex halimus* es un arbusto de aptitud forrajera que puede emplearse en restauración de terrenos degradados y prevención de incendios forestales en las regiones mediterráneas áridas. En el presente trabajo, desarrollado en el nordeste de la provincia de Granada, se evalúan distintas técnicas de implantación en campo, su establecimiento y desarrollo, así como su resistencia al pastoreo. La siembra directa en campo presenta un nulo éxito, posiblemente debido a la depredación por animales silvestres y la sequía estival. La plantación con individuos procedentes de vivero obtiene un porcentaje de supervivencia a los tres años superior al 75% y facilita un rápido establecimiento y desarrollo de las plantas, que incrementan su talla hasta en un 130% en ese plazo. El pastoreo primaveral, puntual e intenso, priva a los arbustos de la mayor parte de su follaje, aunque no genera la muerte de ninguno de ellos. Tres meses después del pastoreo, los arbustos ramoneados presentan un menor fitovolumen que los excluidos al ganado, pero han mostrado una capacidad de rebrote similar a ellos. Además, por efecto del pastoreo primaveral, los renuevos tienen un mayor contenido de humedad en el verano que las ramas de los arbustos no consumidos. El empleo de protectores individuales no dificulta el desarrollo de los arbustos no pastados, ni mejora la resistencia al pastoreo de aquellos que han sido consumidos por el ganado.

## Summary

*Atriplex halimus* is a forage shrub that can be used in the arid Mediterranean region for degraded land restoration and wildfire prevention. In this piece of research, which has been carried out in northeastern Granada (Spain), we evaluate different seeding and planting techniques, the establishment and development of *A. halimus*, as well as its resistance to grazing. Direct sowing has shown no success, probably due to wild animal depredation and summer drought. Planting with shrubs grown in nurseries has achieved a survival percentage of over 75% after three years, allowing a fast establishment and development of the plants, which have increased their height by as much as 130%. The intense spring grazing deprives bushes of most of their foliage, although it doesn't cause the death of any of them. Three months after grazing, browsed shrubs have a smaller volume

than those excluded to livestock, but they have shown a similar resprouting capacity. The new shoots grown after grazing have shown greater water content in summer than unconsumed plants' shoots. The use of individual protectors doesn't hinder the growth of non-browsed bushes, neither does it improve the resistance of those subjected to livestock grazing.

## Introducción

*Atriplex halimus* L. es un arbusto de la familia de las quenopodiáceas que habita en el contorno de la región mediterránea. En la Península Ibérica, podemos encontrarlo tanto en las zonas áridas y esteparias del interior como en los litorales mediterráneo y atlántico sur. Crece en los terrenos salinos, incluso sobre suelos arenosos (López González, 2001).

Desde un punto de vista fisiológico, realiza fotosíntesis tipo  $C_4$ , una adaptación a entornos con escasez de agua, gran intensidad lumínica y altas temperaturas. Al igual que sucede con otras especies de su familia, *Atriplex halimus* presenta un elevado valor bromatológico. El contenido en proteína bruta es equivalente o superior al de las leguminosas y la digestibilidad es muy elevada (Barroso *et al.*, 2005). Aunque existe alguna voz discrepante (Álvarez *et al.*, 2005), la literatura apunta a valores de proteína bruta de 15-20% y digestibilidad superior al 60% (Correal, 1993). Además, entre las quenopodiáceas arbustivas que se emplean en el sudeste peninsular, es una de las especies de mayor palatabilidad e índice de aprovechamiento por el ganado (Oral *et al.*, 1991). Debido a estas positivas características, se ha utilizado frecuentemente en regiones mediterráneas áridas para la restauración de entornos degradados con vocación pastoral (Le Houérou, 1992). Su resultado en plantaciones españolas ha sido el más positivo entre el

\* Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1. 18008-Granada, España.

conjunto de especies arbustivas forrajeras ensayadas (Delgado, 1992; Otal *et al.*, 1995).

En el sudeste ibérico, Correal y Sotomayor (1999) proponen la utilización de *A. halimus* en fincas ganaderas como reserva forrajera invernal que propiciaría alimento suficiente para las necesidades de mantenimiento de las ovejas. Valderrábano *et al.* (1996) confirman la suficiencia de este alimento para el ganado no gestante ni lactante. La combinación de este arbusto forrajero con la siembra de cereales dota a las fincas ganaderas de una mayor estabilidad productiva ante la disparidad interanual de precipitaciones (Jones y Arous, 2000), siendo la producción forrajera de *A. halimus* más constante que la de otros arbustos (Rahmoune *et al.*, 2004).

Aunque varias especies del género *Atriplex* han sido caracterizadas como muy sensibles al pastoreo (Le Houérou, 1992), *A. halimus* es tolerante a un pastoreo intenso y breve, recuperándose totalmente al año de haber sido pastada (Valderrábano *et al.*, 1996).

Este arbusto presenta un alto y constante contenido de sales en sus hojas, acumulando en sus pelos el exceso que pueden presentar los suelos salinos (Mozafar y Goodin, 1970). Las hojas contienen de tres a cinco veces más minerales que los tallos (Andueza *et al.*, 2005). La abundancia en sales presenta una doble virtud: incrementa su atractivo para el ganado y, además, resulta una especie poco inflamable y de bajo poder calorífico ante el fuego, por lo que ha sido propuesta su utilización en la prevención de incendios forestales (Vélez, 2000). La combinación que se produce al tener un buen valor pastoral junto a una baja inflamabilidad convierte a esta especie en una candidata idónea para su empleo en áreas cortafuegos que están sujetas a un mantenimiento basado en el control del desarrollo de la vegetación por parte del ganado, al ser un alimento que atrae a los animales pero no incrementa el riesgo de incendios.

Gracias a sus cualidades, esta especie podría tener múltiples aplicaciones en Andalucía oriental. A través de este trabajo se pretende discernir cuáles son las técnicas más adecuadas para su implantación en este territorio, evaluar su establecimiento y observar su capacidad de respuesta ante la presión ganadera.

## Material y métodos

El material y los primeros resultados de esta experiencia son fruto de un proyecto de investigación deno-

minado *Aplicación de especies autóctonas C<sub>4</sub> y CAM en programas de revalorización y desarrollo de zonas áridas y semiáridas del mediterráneo español*, que ha sido llevado a cabo entre los años 2002 y 2005 por un equipo de investigadores coordinados por el Dr. González Rebollar (Estación Experimental del Zaidín - CSIC). En el marco de este proyecto, financiado por la Fundación Ramón Areces, en el mes de marzo de 2003 se iniciaron varios ensayos de establecimiento de *A. halimus* en campo, tanto mediante siembra como por plantación.

## Área de estudio

Las parcelas experimentales se encuentran en la finca Cortijo Becerra, que está situada en el municipio de Guadix (provincia de Granada, España), en la unidad geomorfológica comúnmente denominada *Hoya de Guadix-Baza* (ver Figura 1). Las coordenadas geográficas de este emplazamiento son 37°26' Norte y 3°06' Oeste, y se encuentra a unos 970 metros de altitud sobre el nivel del mar.

Se trata de un entorno climáticamente duro, con temperaturas que todos los años oscilan entre -5 °C y 36 °C, aunque se han llegado a registrar mínimas de -19 °C y máximas de 40 °C en la estación meteorológica allí instalada desde el año 1995. La continentalidad del clima viene acompañada de una intensa aridez, provocada por el efecto de *sombra de lluvias* que ejercen las montañas circundantes sobre esta hoya. Entre los años 1996 y 2005, la estación meteorológica ha recogido

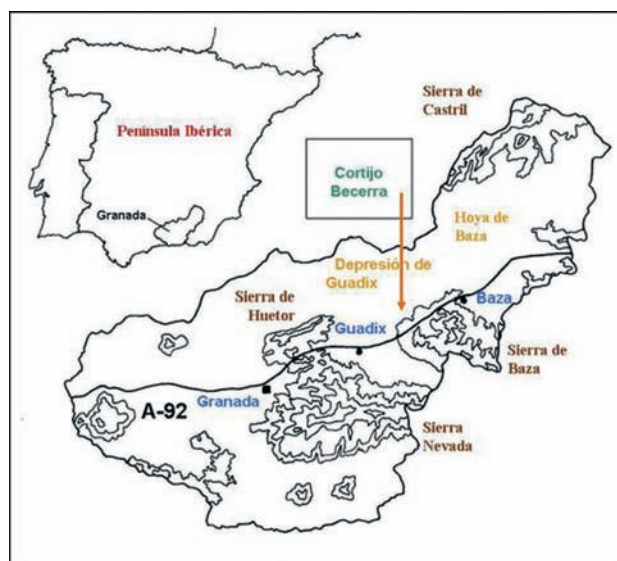


FIGURA 1. Localización del área de estudio.

una precipitación media anual de 301 mm, con extremos de 488 y 168 mm anuales. Según la clasificación de Rivas-Martínez (1987), el clima es Mesomediterráneo Semiárido.

Los suelos sobre los que se asientan las parcelas son fondos de rambla, terrenos agrícolas de secano en abandono desde el año 1993. La caracterización realizada por Ripoll (2004), indica que nos encontramos ante un Fluvisol-arenico (clasificación FAO), con un pH próximo a 8, textura arenosa-franca y muy baja capacidad de retención de agua.

Debido al rigor climático y a la pobreza del suelo, la serie de vegetación correspondiente al área de estudio es la mesomediterránea semiárida de la coscoja (*Rhamno lycioidis* - *Querceto cocciferae* S.), cuya comunidad cabeza de serie es un pinar-coscojar denso en su óptimo en el que dominarían la coscoja (*Quercus coccifera*) y el pino carrasco (*Pinus halepensis*) (Valle, 2003).

## Siembra

Las semillas utilizadas en este ensayo son de dos procedencias distintas: Cabo de Gata (Almería) y Hoya de Guadix-Baza (Granada). Estas semillas se caracterizaron mediante un análisis de pureza, para el que se emplearon cuatro lotes de semillas con un peso de 250 mg/lote. En cada lote se separaron las semillas del resto de impurezas presentes. La pureza se calculó mediante el porcentaje que suponen las semillas en el conjunto del material que compone cada lote, dato indispensable para preparar la dosis de siembra adecuada a partir del material recolectado. Además, mediante el conteo de las semillas extraídas en cada lote se determinó su peso medio, que permite calcular el número de semillas correspondientes a una dosis de siembra determinada.

Con el objetivo de determinar qué origen de semilla y en qué dosis de siembra sería más adecuada para el establecimiento de plantas de *A. halimus* en campo, se realizaron siembras experimentales con semillas de ambas procedencias (Cabo de Gata y Hoya de Guadix-Baza). Para cada una de ellas se ensayaron tres dosis de siembra (10, 15 y 30 kg/ha), con cuatro réplicas para cada dosis y bajo un diseño de bloques al azar. Cada una de las réplicas tenía un tamaño de 4 x 2 m, por lo que la superficie total del ensayo abarcaba unos 200 m<sup>2</sup>, perímetro que no fue vallado. La siembra se realizó en marzo de 2003, y no recibió ningún riego.

El seguimiento se realizó mediante el conteo, en cada réplica, del número de plantas vivas presentes en ocho cuadrados de tamaño 50 x 50 cm.

## Plantación

En marzo de 2003 se completó la plantación de dos parcelas experimentales de *A. halimus*, una sobre una ladera de suave pendiente, y la otra en un terreno llano de fondo de rambla. En cada una se plantaron 100 ejemplares de una savia de edad, en un marco de 4 x 2 m. La técnica empleada fue el ahoyado manual, dejando un pequeño alcorque y colocando protectores cilíndricos (12 cm de diámetro por 40 de alto) de malla metálica para cada planta.

Estas plantaciones fueron objeto de un seguimiento trimestral en el cual se anotaba la talla del arbusto (medida hasta la hoja viva más alta) o, en su caso, si había muerto. A partir de estos datos se han calculado la supervivencia desde el inicio de la experiencia, las marras entre seguimientos y el crecimiento intra e interanual de las plantas.





### Pastoreo

Tal y como se ha indicado en la introducción, además de ser una planta muy adecuada para la restauración de terrenos degradados, *A. halimus* es una especie de gran interés como complemento en la dieta del ganado. Por ello, no interesa únicamente la capacidad de establecimiento de los arbustos, ya valorada con las anteriores experiencias, sino también su capacidad de resistencia al pastoreo. En 2006, a los tres años de la plantación de los arbustos y considerando que están plenamente establecidos, se planifica una segunda fase de la experiencia.

Los objetivos son valorar el efecto de un pastoreo intenso sobre la supervivencia y desarrollo de los arbustos, así como la utilidad de los protectores individuales como herramienta de protección parcial. Además, se observarán los cambios que el pastoreo puede provocar sobre el contenido en humedad de las plantas, que puede afectar a su utilidad para el pastoreo y la prevención de incendios.

Para ello, se ha realizado un diseño factorial en el que se combinan dos factores: el protector individual (presencia/ausencia) y el pastoreo (sí/no). El primer factor se maneja manteniendo o retirando los protectores y, el segundo, mediante el vallado con tela metálica

del conjunto de arbustos que no deban ser pastados, excluyendo así al ganado de la zona.

Para esta experiencia contamos con dos bloques de arbustos en dos situaciones diferentes (llano y ladera), seleccionándose 72 plantas en cada uno de ellos. Según este diseño, cada bloque constituye una réplica que se divide en cuatro lotes de 18 plantas, siendo distinto en cada uno de ellos el tratamiento recibido. A partir de la última medición de alturas (septiembre de 2005) realizada como seguimiento del resultado de la plantación, se crearon en cada bloque cuatro grupos muy similares en talla. Para facilitar las tareas de campo, se forzó que las plantas que debían estar protegidas por un vallado fueran colindantes.

En febrero de 2006, una vez retirados los protectores individuales a los lotes que debían recibir ese tratamiento, se procedió a medir nuevamente la altura y, en esta ocasión, los diámetros cruzados de cada planta, pudiendo calcular así su fitovolumen, que se asimila al de un cilindro. Esta variable, que constituye la principal referencia para realizar el seguimiento de los arbustos, no podía medirse con anterioridad, ya que se ve ligeramente afectada por la retirada de los protectores, al ser una operación en la cual las plantas de mayor tamaño pueden perder alguna rama. Empleando este resultado se vuelven a evaluar los lotes prediseñados, y se detectan diferencias entre sus fitovolúmenes medios que, a pesar de no ser estadísticamente significativas, se opta por corregir mediante ligeros cambios en el trazado del vallado y restitución o retirada de algunos protectores individuales. Así, se consigue que los fitovolúmenes medios sean muy similares entre los lotes dentro de cada uno de los bloques.

A comienzos de mayo de 2006 se procedió a aplicar el tratamiento de pastoreo a los dos bloques de *A. halimus*, con la colaboración del pastor que aprovecha los pastos de la finca en esa época del año. El rebaño lo constituían 500 ovejas de raza segureña y 30 cabras, que se recogían en un aprisco de las proximidades. Al comienzo de su careo matinal se condujo a los animales hacia las plantaciones para que consumieran los arbustos. El pastoreo intenso se completó en una única mañana pero, mediante la adecuada retención del ganado y por el atractivo que despierta esta especie, resultó en el consumo casi total del follaje de las plantas expuestas a él.

Tras el pastoreo, se procedió a medir nuevamente la altura y los diámetros cruzados de todas las plantas. En los arbustos pastados se diferenciaron y midieron



tanto el fitovolumen del ramaje, constituido por las ramas desprovistas de hojas, como el fitovolumen del follaje, que se correspondía con el núcleo central de la planta que aún mantenía hojas. Al ser el fitovolumen la principal variable que se emplearía para el seguimiento de la evolución de las plantas, resultaba inevitable realizar esta distinción, ya que de otro modo quedaría camuflado el efecto que había tenido el pastoreo sobre las plantas. Para valorar la recuperación de los arbustos ante el tratamiento, esta medición se repitió a finales de julio de 2006, cuando ya se había observado un notable rebrote. En esta ocasión, no fue necesario medir ambos fitovolúmenes, ya que no se observó ningún arbusto con abundancia de ramas desprovistas de hojas.

Coincidiendo con esta última medición, se tomaron muestras de las ramas de las plantas con la intención de detectar diferencias en el contenido de humedad entre las plantas excluidas al pastoreo y las consumidas por el ganado, sin hacer distinciones entre plantas con protector individual o sin él, ya que este último factor no parecía poder tener ningún efecto. En cada uno de los dos bloques se tomaron 30 muestras (15 por tratamiento) de ramas laterales de diámetro similar,

que se pesaron en verde con un dinamómetro de campo (precisión 0,1 g), fueron secadas hasta peso constante en una estufa de aire forzado a 60 °C y se determinó su peso seco en una báscula en laboratorio.

Todos los datos recogidos han sido analizados estadísticamente utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows 5.1 con el apoyo teórico de Collins y Seeney (1999) y Zar (1999). Cuando los datos reúnen los requisitos de normalidad, se han aplicado el test de la *t* de Student y el análisis de la varianza, empleando el test de Duncan para el contraste de medias. En caso contrario, se ha optado por los tests no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

## Resultados y discusión

### Siembra

La pureza de las semillas recolectadas fue de un 20% para la procedencia Cabo de Gata y del 37 % para la de la Hoya de Guadix-Baza. El peso medio de una semilla de esta especie resultó  $0,00073 \pm 0,00009$  g. Este resultado determinó, por ejemplo, que una dosis de siembra de 10 kg de semillas por hectárea equivalía a 1370 semillas por metro cuadrado y que, debido a su pureza, la cantidad de siembra a utilizar fuera de 50 kg/ha en el caso de la procedencia de Cabo de Gata y de 27 kg/ha para las semillas de la Hoya de Guadix-Baza.

Las siembras en campo, como puede observarse en la Tabla 1, han tenido un resultado claro: ninguna combinación de procedencia y dosis de siembra ha permitido el establecimiento a medio plazo de las plántulas. A los nueve meses de iniciar la experiencia, todas las plántulas germinadas habían muerto.

Centrándonos en las primeras etapas, las semillas procedentes del entorno mostraron una mayor germi-

TABLA 1

Densidad de plantas en las siembras en campo, según dosis de siembra, procedencia y fecha de observación

Fecha	Número de plántulas por metro cuadrado					
Junio/03	3,88	2,25	3,75	11,25	50,63	39,25
Septiembre/03	0	0,25	0,38	2,00	1,00	11,25
Noviembre/03	0	0	0	0,13	0,63	0,38
Enero/04	0	0	0	0	0	0
Abril/04	0	0	0	0	0	0
Dosis de siembra	10 kg/ha	15 kg/ha	30 kg/ha	10 kg/ha	15 kg/ha	30 kg/ha
Procedencia	Cabo de Gata			Hoya de Guadix-Baza		

nación y supervivencia inicial frente a las originarias de Cabo de Gata. Aunque los ensayos en laboratorio habían mostrado que las semillas de esta procedencia tenían un porcentaje de germinación de las semillas sin tratar notablemente inferior, este motivo, por si sólo, no explica el comportamiento observado. Mientras las semillas de la Hoya de Guadix-Baza respondieron a la siembra con una germinación media del 1,53% en el primer seguimiento, las almerienses apenas llegaron a una décima parte de esto, alcanzando un 0,16%.

Con respecto a las dosis de siembra, únicamente en la procedencia local se observan valores más altos con el empleo de dosis mayores de siembra, siendo una tendencia que se desdibuja rápidamente en el tiempo ante la fuerte mortandad cosechada.

En todo caso, los resultados parecen indicar que han existido elementos que han influido sobremanera en sus pobres resultados. Por un lado, algunos autores advierten que las siembras de primavera no permiten un desarrollo radical suficiente para soportar el rigor de la sequía estival (Stidham *et al.*, 1980). Por otro lado, la depredación por parte de conejos puede haber resultado letal para las jóvenes plántulas. Se han observado vivares en las proximidades y multitud de

cagarrutas en las mismas siembras. Asimismo, las innumerables hormigas que pueblan estos terrenos, entre otros agentes, han podido ejercer una constante depredación de semillas. Lo cierto es que una conjunción de factores difícil de determinar ha conllevado el fracaso de la siembra. Antes de descartar esta técnica de repoblación de *A. halimus*, habría que ensayar su utilización con protección frente a los herbívoros, optando por otras épocas de siembra o, incluso, aportando riegos que permitieran a las plántulas sobrevivir el primer verano.

### Plantación

En las condiciones ensayadas, la plantación ha resultado ser un tratamiento mucho más exitoso para la introducción de *A. halimus* que las siembras.

La supervivencia de las plantas a lo largo de los tres años del seguimiento queda reflejada en la Figura 2. A partir del segundo año (mayo de 2005) esta variable se estabiliza entre el 75 y el 80% para ambas réplicas, resultado similar al de otras experiencias (Cañellas *et al.*, 2004).

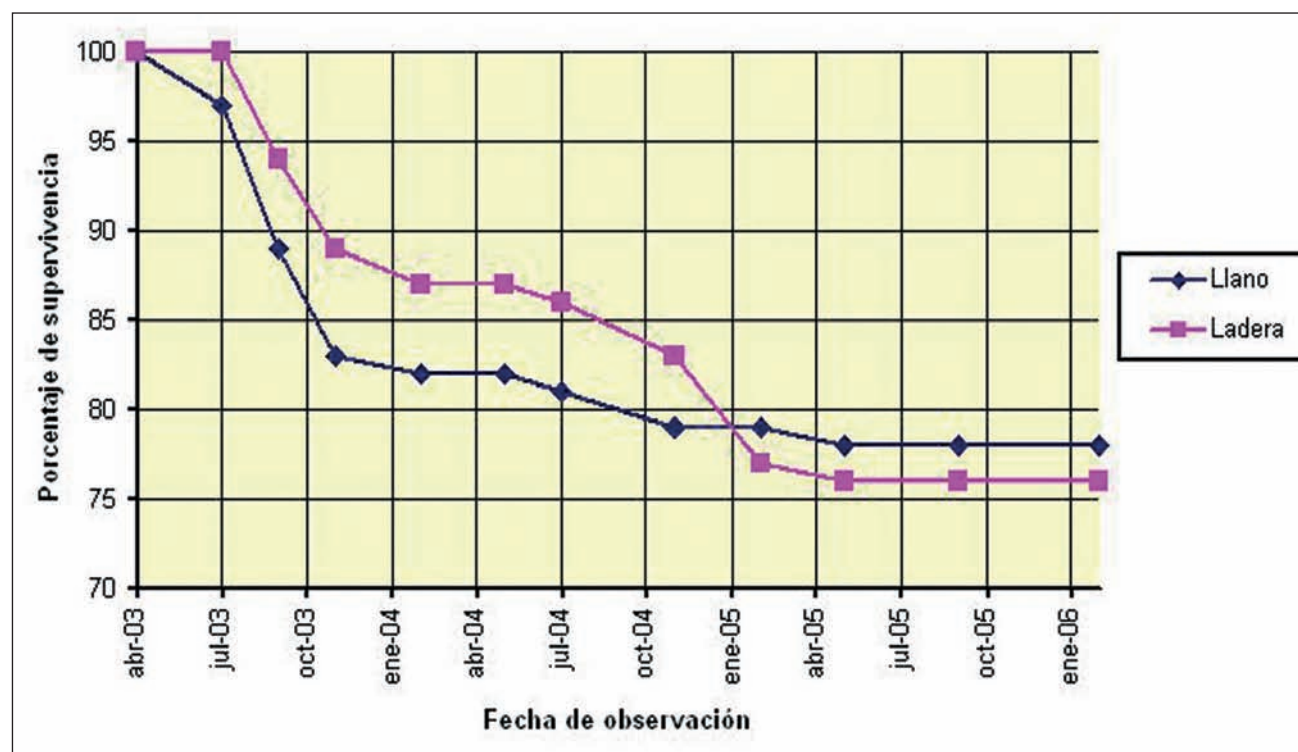


FIGURA 2. Supervivencia de las plantas de *Atriplex halimus* a lo largo de tres años.

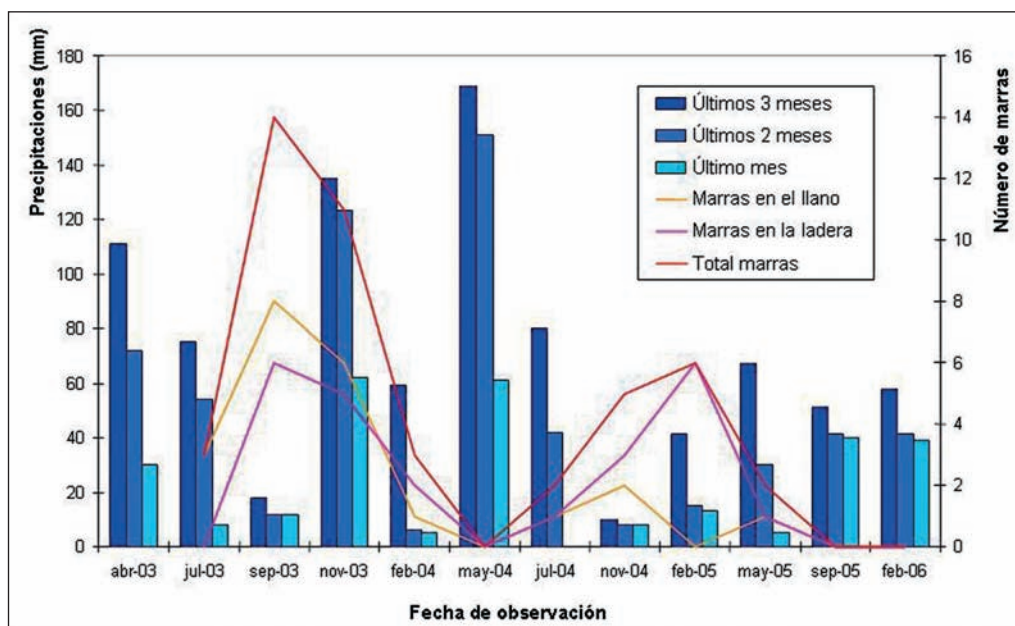


FIGURA 3. Relación entre mortalidad y pluviometría en la zona experimental.

A partir de los datos meteorológicos se ha elaborado la Figura 3, en la que se combinan las precipitaciones recogidas en los últimos meses anteriores a cada uno de los muestreos con la mortalidad registrada en ellos.

Aunque lo habitual es que sea en el primer año tras la plantación cuando se registra el mayor número de marras, en nuestro caso nos encontramos que el segundo verano también ha impuesto condiciones muy severas a los arbustos. En la Figura 3 puede observarse una relación entre el máximo relativo de mortandad registrado en febrero de 2005 y las escasas precipitaciones correspondientes a esas fechas. Los datos de la estación meteorológica indican que, tras un primer año relativamente húmedo, las plantas tuvieron que soportar una fuerte sequía entre junio de 2004 y agosto de 2005, periodo en el que tan sólo se recogieron 137 mm de lluvia, dato que corroboraría la presunción de que la mortandad está principalmente ligada a la carencia de agua. Las bajas temperaturas, que en enero de 2005 llegaron hasta los  $-19^{\circ}\text{C}$  también podrían haber ocasionado algunas de las muertes registradas al final del invierno.

Las mediciones de la talla de los arbustos en distintas épocas a lo largo del año, reflejadas en la Figura 4, dan una muestra de la fenología anual de esta especie. A finales de primavera comienza la floración de *A. halimus*, que produce largas inflorescencias al final de sus tallos y ramas, incrementando notablemente su

tamaño. La fructificación se completa a lo largo del otoño, pero los escapos florales se mantienen verdes sobre la planta durante buena parte del invierno y aún se encuentran, ya secos, en la primavera siguiente. Esto motiva las fluctuaciones que se producen en el tamaño de los arbustos a lo largo del año, que presentan mínimos relativos en el mes de mayo, uno de los pocos momentos del año en que las inflorescencias están totalmente secas.



Esta característica hace que el crecimiento de las plantas sólo pueda valorarse comparando mediciones realizadas en la misma época del año, preferentemente en la época sin floración, tal y como se ha realizado en la Tabla 2.

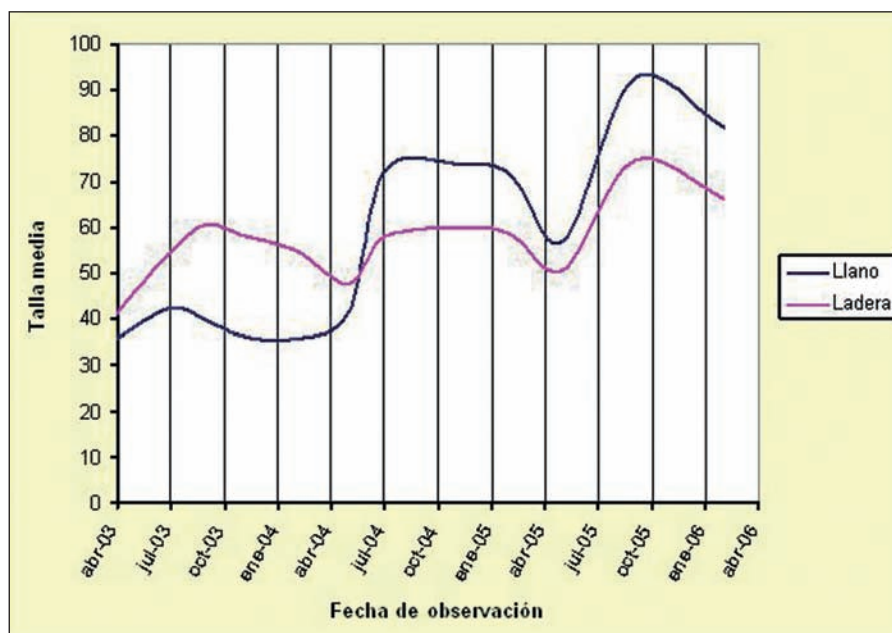


FIGURA 4. Evolución de la talla media de los arbustos a lo largo de tres años.

TABLA 2

Talla (cm) de las plantaciones de *Atriplex halimus*, por años y bloques

Bloque		Años			
		2003	2004	2005	2006
Llano	Media $\pm$ sd	35,7 $\pm$ 0,7	41,7 $\pm$ 0,8	56,9 $\pm$ 1,6	81,7 $\pm$ 2,5
	Mín - Máx	20 - 50	27 - 60	9 - 92	32 - 139
Ladera	Media $\pm$ sd	41,5 $\pm$ 0,8	47,6 $\pm$ 1,1	50,7 $\pm$ 1,7	66,3 $\pm$ 3,2
	Mín - Máx	24 - 58	33 - 77	12 - 81	28 - 154

Al inicio de la experiencia, las plantas del bloque de ladera presentaron, por azar, una talla media significativamente superior ( $t = 5,53$ ;  $P < 0,001$ ) a las del llano. Durante el primer año se mantiene esta diferencia, e incluso las plantas de ladera realizan su primera floración (ver Figura 4). En el segundo y tercer año, en cambio, las plantas del llano presentan un desarrollo notablemente mayor que las de ladera, obteniendo tallas significativamente mayores según el test de Mann-Whitney ( $W = 1921$ ,  $P < 0,001$  y  $W = 4036$ ,  $P < 0,001$  respectivamente). La Figura 2 nos mostraba que en la situación de llano la mortalidad se concentraba en el primer año. Aparentemente, tras ese año crítico, las plantas de este bloque quedan plenamente establecidas y se desarrollan mucho más vigorosamente que las de ladera.

Profundizando en esas diferencias, la Figura 5 compara la distribución de tamaños que nos encontra-

mos en los dos bloques al final de la experiencia. En contraste con la réplica del llano, la situación de ladera aún presenta un número relativamente elevado de plantas de talla baja, algunas incluso con un tamaño inferior al del momento de la plantación, lo que rebaja notablemente la talla media que alcanza este bloque. El reducido tamaño de estas plantas podría llevar a pensar que pueden morir ante una nueva situación de estrés por sequía, helada o pastoreo.

Los resultados descritos apuntan a que, en términos generales, la técnica de plantación es adecuada para la repoblación de *A. halimus* en este territorio. La supervivencia de las plantas es alta y su desarrollo, vigoroso. Aunque el diseño experimental no permite extraer conclusiones al respecto, las diferencias observadas entre las dos réplicas (ladera y llano) indican la importancia que puede tener la selección del lugar óptimo para la repoblación. Las condiciones edáficas e

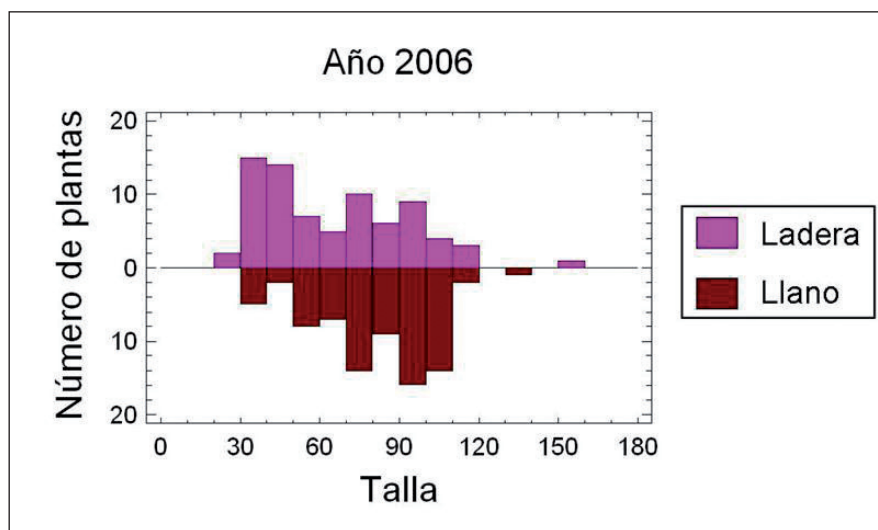


FIGURA 5. Distribución de tamaños de las plantas de *Atriplex halimus*, por clases de talla y bloques.

hídricas son las que, probablemente, hayan tenido mayor influencia en estas diferencias y señalan que los terrenos más profundos que recogen escorrentía o están más próximos al fondo de la rambla tienen mejores condiciones para la repoblación.

Tal y como suele ser recomendable, en la repoblación con plántones de *A. halimus* se emplearon protectores individuales de malla metálica. El resultado obtenido con las siembras, probablemente muy mermadas por la herbivoría, indica la pertinencia de utilizar estos protectores para las débiles plantas recién introducidas. Sin embargo, una técnica como ésta, que conlleva costes, podría haber sido testada mediante un diseño experimental más completo. La experimentación con ganado, a los tres años de la plantación, es la que podrá establecer si su función protectora es de interés en este estadio.

### Pastoreo

El primer resultado a mencionar es que el tratamiento de pastoreo intenso no ha provocado la muerte de ninguno de los arbustos expuestos a él: la supervivencia ha sido del 100 % en todos los tratamientos y en las dos réplicas. Ni siquiera las plantas más pequeñas y desprovistas de protector han sufrido daños letales, aunque el riesgo no era únicamente el consumo de sus tejidos, sino también el pisoteo por la aglomeración de animales.

El pastoreo que ejerció el rebaño de ovejas y cabras, como puede observarse en las fotografías, privó de la mayor parte de sus hojas a los arbustos expuestos a él.

En la Tabla 3 se recoge la diferencia en el volumen de follaje que presentaban las plantas sometidas a los distintos tratamientos.



TABLA 3

Volumen (dm<sup>3</sup>) del follaje de *Atriplex halimus* inmediatamente después del pastoreo, según bloques y tratamientos

Situación		Tratamiento			
		Pastoreo con protector	Pastoreo sin protector	Excluido con protector	Excluido sin protector
Llano	Media $\pm$ sd	25,45 $\pm$ 4,56	18,68 $\pm$ 4,21	499,64 $\pm$ 99,4	415,16 $\pm$ 50,20
	Mín - Máx	5,39 - 69,18	5,90 - 67,74	654,47 - 1361,51	86,86 - 972,79
Ladera	Media $\pm$ sd	6,84 $\pm$ 0,83	8,63 $\pm$ 2,38	115,33 $\pm$ 25,89	83,15 $\pm$ 31,19
	Mín - Máx	2,85 - 15,97	0,295 - 43,43	19,63 - 358,56	2,65 - 465,31

Considerando que cada uno de esos cuatro grupos partía de un fitovolumen muy similar (sin diferencias significativas dentro de cada bloque con un nivel de confianza del 99%), los resultados muestran claramente la intensidad que tuvo el pastoreo, aunque se realizara en un único día y el ganado fuera principalmente ovejas, que tienen una menor capacidad de reducir el fitovolumen de *A. halimus* (Valderrábano *et al.* 1996).

Debido a la selección positiva que realiza el ganado por las partes más tiernas de las plantas, el volumen del follaje de las plantas ramoneadas se vio mucho más reducido que el volumen de su ramaje (ver Figura 6), cuando es precisamente a partir de éste que se produce el rebrote.

En la Figura 7 se ha dibujado la evolución que ha tenido la variable fitovolumen desde comienzos del mes

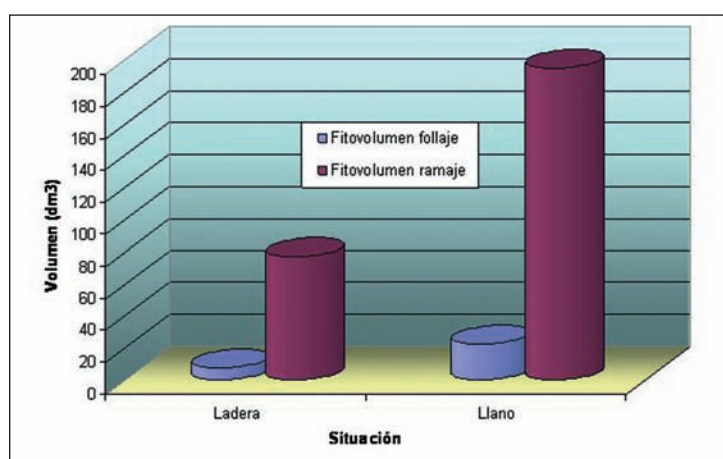


FIGURA 6. Fitovolumen medio del follaje y del ramaje de los arbustos pastados, inmediatamente después del pastoreo, por bloques.

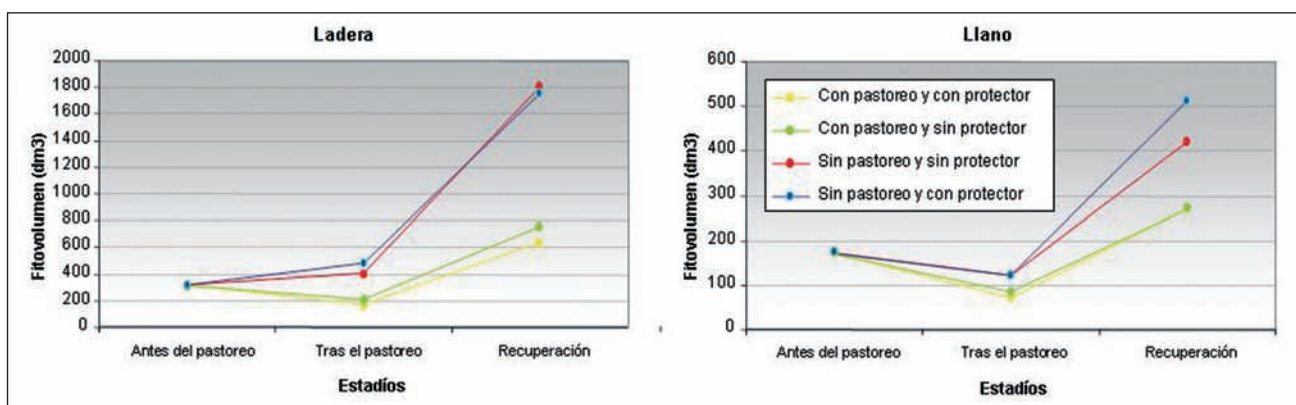


FIGURA 7. Evolución del fitovolumen medio de los arbustos, por tratamientos y bloques.

de febrero (antes del pastoreo) hasta finales de julio (recuperación), con el valor intermedio de mayo, que en este caso es el volumen del ramaje tras el tratamiento de pastoreo.

Como puede inferirse de la diferente escala empleada en los gráficos, los valores de fitovolumen alcanzados han sido muy superiores en el llano. La media de los tratamientos excluidos al pastoreo, por ejemplo, ha llegado hasta los 1.770 dm<sup>3</sup> en el llano frente a los 470 dm<sup>3</sup> de la ladera. A pesar de ello, la respuesta en ambas réplicas según los tratamientos aplicados permite hacer una misma lectura.

Puede observarse que las plantas pastadas no sólo han recuperado el fitovolumen que tenían antes del pastoreo, sino que lo han incrementado. En la situación de ladera, su fitovolumen medio ha pasado de 162 a 273 dm<sup>3</sup>, y de 314 a 696 dm<sup>3</sup> en el llano. Dado que estamos comparando una medición de julio con una de febrero, es posible que parte de la diferencia que se registra sea debida al momento fenológico de las plantas. En el seguimiento realizado en verano, sin embargo, se ha podido observar que las plantas pastadas apenas iniciaban la floración, mientras que las excluidas al ganado se encontraban con los escapos florales plenamente desarrollados. Este retraso fenológico probablemente esté motivado por el propio pastoreo, ya que las plantas están obligadas a reponer sus tejidos fotosintéticos antes de poder florecer. Por tanto, se puede afirmar con cierta seguridad que el crecimiento registrado entre febrero y julio no está sobrevalorado, y que el pastoreo no ha comprometido, en ningún caso, el desarrollo de las plantas. Las diferencias observadas en función del factor *pastoreo* deberán ratificarse con las mediciones del próximo año, cuando los momentos fenológicos estén nuevamente acompasados. De hecho, se recomienda valorar la recuperación de las plantas tras un período de pastoreo inmediatamente antes del inicio del siguiente (Valderrábano *et al.* 1996). Por lo tanto, los resultados aquí presentados se mejorarán con la evaluación que se realice en febrero de 2007.

La elección del fitovolumen como variable principal, motivada por ser empleada frecuentemente (Otal *et al.*, 1995) y disponer de regresiones fitovolumen-biomasa en la literatura (Valderrábano *et al.*, 1996) genera algunas dificultades. En particular, dado que los valores de fitovolumen crecen exponencialmente, no presentan una distribución normal al tener una asimetría tipificada muy elevada. En los análisis estadísticos se ha probado a utilizar, sin obtener resultados mucho mejo-

res, transformaciones de esta variable, la altura y diámetro medio (las variables que lo componen) así como su producto, que es proporcional a la superficie externa del cilindro. Finalmente, se ha optado por realizar tests no paramétricos. Para soslayar las diferencias en tamaño existentes entre los dos bloques y poder integrarlos en un mismo análisis, se han evitado las mediciones en términos absolutos, optando por variables que relacionan el tamaño actual con el inicial de los arbustos.

Las mediciones procedentes del muestreo de julio, que ya se corresponden con un momento de fuerte recuperación de los arbustos, no han podido ser analizadas a través de un análisis de varianza factorial que integrara los factores *pastoreo* y *protector*, ya que los valores registrados se alejan notablemente de la normalidad. El contraste de Kruskal-Wallis aplicado sobre la variable Fitovolumen de julio / Fitovolumen de febrero, indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medianas ( $P < 0,001$ ), identificándose que el factor *pastoreo* es el que produce esas diferencias, mientras que el protector no tiene un efecto claro. El empleo de otras variables (Diámetro julio / Diámetro febrero, Altura  $\times$  Diámetro julio / Altura  $\times$  Diámetro febrero) confirman este hecho.

Para analizar si la capacidad de rebrote de las plantas se ha resentido con el pastoreo, se ha procedido a comparar los arbustos ramoneados frente a los no pastados, excluyendo el factor protector, que no parece tener ningún efecto. Podemos definir el rebrote como el crecimiento relativo que han tenido los arbustos a partir del ramaje dejado por el ganado tras el pastoreo, que ha podido ser evaluado con las mediciones del mes de julio. Las variables empleadas y su resultado quedan reflejadas en la Tabla 4. Aunque nuevamente la distribución de los datos se aleja de la normalidad, en todos los casos el test de Kruskal-Wallis descarta la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los distintos tratamientos a un nivel de confianza del 95%. Este hecho indica que las plantas pastadas han tenido una capacidad de rebrote equivalente a las excluidas al pastoreo, si bien el partir de un volumen inferior las hace tener dimensiones absolutas menores.

Resulta lógico que el análisis de todos los datos en conjunto arroje la conclusión de que el factor *pastoreo* tiene un efecto mucho mayor que el factor *protector individual*, con las matizaciones debidas a la situación de los dos bloques. El efecto esperable debido a los protectores sería distinto en función de que el arbusto

TABLA 4

Dimensiones relativas de los arbustos «pastados» (según tratamiento y variable)

Tratamiento	Medición del mes de julio Medición del mes de mayo			
	Variable			
	Fitovolumen Media $\pm$ sd	Altura Media $\pm$ sd	Diámetro Media $\pm$ sd	Diámetro * Altura Media $\pm$ sd
Pastoreado	5,53 $\pm$ 1,03	1,37 $\pm$ 0,06	1,70 $\pm$ 0,07	2,36 $\pm$ 0,17
No pastoreado	4,20 $\pm$ 0,49	1,40 $\pm$ 0,06	1,86 $\pm$ 0,11	2,68 $\pm$ 0,27

fuera consumido por el ganado o no, ejerciendo una protección o limitando su desarrollo, respectivamente. Procede, por tanto, estudiar separadamente su efecto sobre los arbustos.

Al comienzo de los seguimientos de la plantación se observó que el volumen de algunas plantas se reducía al tamaño de su protector, llevando a pensar que los protectores individuales estaban entorpeciendo su desarrollo, particularmente en anchura. Esta observación posiblemente se debiera al ligero ramoneo que ejercían los conejos y otros herbívoros. En todo caso, al tratarse de protectores de malla, a medida que avanzó el desarrollo de los arbustos, las ramas fueron entretejiéndose con el protector y sobrepasando su volumen, salvo en el caso de las plantas más pequeñas. Al comenzar el ensayo de pastoreo se han retirado la mitad de los protectores y, a medio plazo, podrá valorarse si ejercen algún efecto de constricción. Con las cautelas debidas al breve tiempo de ensayo que ha transcurrido, el test de Mann-Whitney indica la inexistencia de diferencias significativas (nivel de confianza del 99%) en función del factor *protector individual*, tanto entre las medianas de Fitovolumen julio/Fitovolumen febrero como para

la variable Diámetro julio/Diámetro febrero. Aparentemente, pues, el protector individual no está suponiendo una limitación al desarrollo de los arbustos no pastados.

Según lo visto en la Figura 7, tampoco parece que los protectores ejerzan ningún efecto positivo sobre las plantas pastoreadas. Según lo observado en campo, debido al volumen que han alcanzado los arbustos al cabo de tres años, el propio ramaje de las plantas tiene un efecto disuasorio sobre el consumo de su núcleo central, que se encuentra protegido por una maraña de fuertes tallos. Por tanto, únicamente podría esperarse que los protectores individuales tuvieran un efecto más notorio sobre los ejemplares de menor tamaño, pero incluso éstos se han recuperado notablemente. Sólo una planta ha sido tronchada debido al pisoteo, aunque ello no le impide tener un aspecto vigoroso. Se han realizado análisis estadísticos sobre los datos procedentes del conjunto de las plantas pastadas. En la Tabla 5 se incluyen las únicas variables para las cuales se han encontrado diferencias significativas que reforzarían la conveniencia de la utilización de protectores individuales en la reducción del impacto ocasionado por el pastoreo.

TABLA 5

Talla relativa a la inicial (febrero de 2006 = 100) del follaje de los arbustos ramoneados, según tratamiento y fecha de observación

Tratamiento	Fecha	
	Mayo 2006 (tras el pastoreo)	Julio 2006 (recuperación)
Con protector individual	65,5	128,2
Sin protector individual	53,4	114,1
Diferencia estadística	W = 879; P < 0,01	t = -2,70; P < 0,005

El resto de las variables testadas no arrojan los mismos resultados, existiendo algunos, incluso, en sentido contrario a éste. Por tanto, no puede concluirse que el factor *protector individual* tenga efectos notables en una mayor protección o mejor recuperación de los arbustos pastados.

Por último, y con respecto al contenido en humedad de los arbustos que se resume en la Tabla 6, puede observarse que tanto el tratamiento de pastoreo como la situación de ladera incrementan significativamente el contenido en humedad de las plantas frente a la media global.

TABLA 6

**Porcentaje de humedad sobre el peso seco de ramas de *Atriplex halimus*, según ubicación y tratamiento**

Ubicación	Tratamiento		
	Pastoreo	Excluido	Todos
Llano	163%	128%	145%
Ladera	175%	143%	159%
Todos	169%	136%	152%

Una vez comprobada la homogeneidad de las varianzas y que los datos siguen una distribución normal, la comparación mediante el test de la *t* de Student indica la existencia de diferencias significativas en el contenido de humedad entre los tratamientos ( $P < 0,001$ ) así como entre las dos ubicaciones ( $P < 0,05$ ). A través de un análisis de varianza factorial se ha descartado la existencia de interacciones entre ambos factores.

Los análisis confirman la expectativa de que los arbustos pastados, al tener que rebrotar más tardíamente, debían tener un contenido en humedad superior. Los tallos más jóvenes mantienen porcentajes de humedad notablemente mayores, a pesar de estar medidos en pleno verano. Esto supone una ventaja significativa de cara al pastoreo, por la oferta de alimento fresco que supone, e incluso para la prevención de incendios forestales, ya que estaríamos ante un arbusto menos inflamable.

Lo que no se esperaba encontrar era diferencias entre las dos ubicaciones y, menos aún, que éstas fueran en sentido contrario a la supuesta mayor disponibilidad hídrica de un terreno llano frente a uno inclinado. Aunque el análisis de estas diferencias requeriría un estudio más detallado, la explicación de este hecho podría radicar en la existencia de una correlación

negativa entre el tamaño o desarrollo del arbusto y el contenido en humedad de sus ramas, tal y como sugieren el mayor volumen y la menor humedad que presentan las plantas del llano.

Los resultados de los distintos análisis que tratan de explicar los efectos que ha tenido el pastoreo sobre las plantas deben valorarse teniendo en cuenta las motivaciones que llevan a la utilización de *A. halimus* en el entorno mediterráneo. Como ya se ha indicado en la introducción, sus principales usos son la revegetación de terrenos degradados, el aprovechamiento pastoral e, incluso, la prevención de incendios forestales. Para fomentar estas dos últimas utilidades, resulta conveniente que el arbusto mantenga una gran vitalidad pero que sus dimensiones no sean excesivas. De otra forma, los tallos se lignificarían, perdiendo calidad nutritiva (Andueza *et al.*, 2005), y buena parte de la producción forrajera no estaría al alcance del ganado, lo que conllevaría una acumulación de biomasa combustible. Por tanto, un cierto grado de pastoreo sobre *Atriplex halimus*, al menos tan intenso como el ensayado aquí y siempre sin que comprometa su supervivencia, puede considerarse una técnica positiva para fomentar los rebrotes frescos y controlar la acumulación de fitomasa.



## Conclusiones

- La siembra directa no es un sistema de repoblación adecuado para *Atriplex halimus*, si no puede asegurarse la protección frente a pequeños herbívoros y/o un suministro de agua que ayude a su establecimiento.
- La plantación ofrece buenos resultados de supervivencia y permite un notable desarrollo de las plantas en un plazo breve de tiempo.
- El pastoreo no provoca ninguna muerte entre los arbustos pastados.
- En comparación con las plantas no consumidas, el pastoreo reduce el incremento de fitovolumen arbustivo, si bien la capacidad de rebrote de las plantas no se ve afectada.
- La utilización de protectores individuales no dificulta el desarrollo de los arbustos no pastados, ni mejora el rebrote de aquellos que han sido consumidos por el ganado.
- El pastoreo primaveral fomenta que las ramas tengan un mayor contenido de humedad en verano.

Las afirmaciones aquí expuestas son fruto de los primeros resultados de esta experiencia. La continuación de las mediciones hasta completar el ciclo anual, así como un progresivo incremento de la intensidad de pastoreo en las próximas campañas (repitiendo el pastoreo en distintos momentos del año) irá permitiendo ampliar estas conclusiones.

## Referencias bibliográficas

- ÁLVAREZ, S.; MÉNDEZ, P.; DÍAZ, C. y FRESNO, M., 2005. «Valoración nutritiva de forrajes adaptados a zonas áridas y su utilización en la alimentación del ganado caprino». En: OSORO, K.; ARGAMENTERÍA, A. y LARRACETA, A. (eds.): *Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural*. SERIDA, Gijón, pp. 229-235.
- ANDUEZA, I. y CORREAL, E., 2005. «Intraspecific variation in *Atriplex halimus*: chemical composition of edible biomass». *Options méditerranéennes*, série A, 67, 377-381.
- BARROSO, F.G.; PEDREÑO, A.; MARTÍNEZ, T.; ROBLES, A.B. y GONZÁLEZ-REBOLLAR, J.L., 2005. «Potencialidad de las especies  $C_4$  como alimento para el ganado en repoblaciones de zonas semiáridas». En: OSORO, K.; ARGAMENTERÍA, A. y LARRACELETA, A. (eds.): *Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural*. SERIDA, Gijón, pp. 351-357.
- CAÑELLAS, I.; ROIG, S.; BACHILLER, A. y MONTOTO, J.L., 2004. «Repoblación con especies del género *Atriplex* en terrenos agrícolas abandonados de clima mediterráneo». En: GARCÍA CRIADO, B.; GARCÍA CIUDAD, A.; VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R. y ZABALZAGOGUEAZCOA, I. *Pastos y Ganadería Extensiva*. SEEP, Salamanca, pp. 659-663.
- COLLINS, C.A. y SEENEY, F.M., 1999. *Statistical experiment design and interpretation*. Ed. Wiley. Chichester, Inglaterra.
- CORREAL, E., 1993. Grazing use of fodder shrub plantations. En: PAPANASTASIS, V. (ed.): *Agrimed research programme - Fodder trees and shrubs in the Mediterranean production systems: objectives and expected results of the EC research contract*. Commission of the European Communities. Luxemburgo, pp. 99-118.
- CORREAL, E. y SOTOMAYOR, J.A., 1999. «Strategies for the utilization of *Atriplex* plantations in a cereal-sheep pastoral zone of NW Murcia (Spain)». En: ETIENNE, M. (ed.): *Dynamics and sustainability of Mediterranean pastoral systems*. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, pp. 217-221.
- DELGADO, I., 1992. «Sobre la introducción de arbustos forrajeros en el secano aragonés». *ITEA*, 88-A, 2, 129-132.
- JONES, M.J. y AROUS, Z., 2000. «Barley-Salt-Bush intercropping for sustainable feed production in a dry Mediterranean steppe environment». *J. Agronomy & Crop Science* 184, 253-260.
- LE HOUÉROU, H.N., 1992. «The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review». *Agroforestry Systems* 18(2), 107-148.
- LÓPEZ GONZÁLEZ, G., 2001. *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- MOZAFAR, A. y GOODIN, J.R., 1970. «Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L.». *Plant Physiology* 45, 62-65.
- OTAL, J.; ALCOLADO, V.; ROMERO, M.J.; BURGOS, A.; CLIMENT, P.; PÉREZ, J.L. y SELVA, M., 1995. «Adaptación y producción de arbustos forrajeros en el sur de la provincia de Ciudad Real». En: *Actas de las XXXV Reunión Científica de la SEEP*, Tenerife, pp. 193-196.
- OTAL, J.; CORREAL, E. y BELMONTE, C., 1991. «Variaciones estacionales de la palatabilidad y consumo por el ganado ovino de diversos arbustos forrajeros preseleccionados en el S.E. español». En: *Pastoralismo en zonas áridas mediterráneas*. SEEP, Murcia, pp. 353-357.
- RAHMOUNE, C.; MAËLEM, S. y BENACEUR, M., 2004. «Etude comparative de rendement en matière sèche et en matière azotée totale de trois espèces de plantes steppiques du genre *Atriplex*». *Options Méditerranéennes*, série A, 60, 219-221.
- RIPOLL, M.A., 2004. *Aprovechamiento de escorrentías superficiales mediante la construcción de microcuencas: aplicación a la forestación en ambientes mediterráneos*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S., 1987. *Memoria y mapa de series de vegetación de España*. Ed. ICONA. Madrid.
- STIDHAM, N.D.; AHRING, R.M.; POWELL, J. y CLAYPOOL, P.L., 1980. «Chemical scarification, moist prechilling and thiourea effects on germination of 18 shrub species». *Journal of Range Management* 33(2), 115-118.
- VALDERRÁBANO, J.; MUÑOZ, F. y DELGADO, I., 1996. «Browsing ability and utilization by sheep and goats of *Atriplex halimus* L. shrubs». *Small Ruminant Research* 19, 131-136.
- VALLE, F., 2003. *Mapa de series de vegetación de Andalucía*. Ed. Rueda. Madrid.
- VÉLEZ, R. (coord.), 2000. *La defensa contra incendios forestales. Fundamentos y experiencias*. Ed. McGraw-Hill. Aravaca (Madrid).
- ZAR, J.H., 1999. *Biostatistical analysis; forth edition*. Ed. Prentice Hall. New Jersey, EUA.

# Epílogo

Cuando en diciembre de 1999 supe del interés del doctor Julio López Gorgé por abordar una investigación multidisciplinar sobre nuestras plantas  $C_4$  & CAM tenía ya algunas claves para que la noticia no me sorprendiera. Pocos meses antes había tenido la oportunidad de asistir a un brillante ensayo suyo sobre el *Don Carlos*, de Verdi. Aquel día, cuando todos esperábamos una conferencia sobre alguno de los aspectos de la Bioquímica, o de la Biología Molecular, que atraían su atención, Julio consiguió mantenernos interesados en los pormenores de esta tragedia. No obstante, para mí, el interés explícito de Julio, sobre este interesante conjunto de plantas  $C_4$  y CAM, ni era ni podía ser una noticia esperada. Igual que no era imaginable que pensase en mí para coordinar el estudio.

Murray Gell-Mann, en las primeras páginas de su conocida divulgación sobre el modelo *quark*, dedica unas entretenidas líneas a la discriminación de Nietzsche entre *apolíneos* y *dionisiacos*.<sup>1</sup> Es decir, entre quienes, en nuestro oficio, hacen del análisis de los datos y de la reflexión desapasionada de los mismos la base de su currículum profesional, y quienes evidencian (evidenciamos) una irremediable tendencia a las síntesis, o la percepción apasionada. En todo caso, como científico que ha tenido siempre a Ramón Margalef entre sus primeros héroes bibliográficos, no oculto mis preferencias por su irónica discriminación entre *quienes lo saben todo de casi nada* y quienes *no saben* (no sabemos) *nada de casi todo*.

Sea como fuere, creo que dentro del abanico de personalidades que cubren estas categorías, ni Nietzsche, ni Gell-Mann, ni Margalef hubieran tenido grandes dificultades en situarnos a Julio y a mí en sectores

diferentes del mismo, con la previsible dificultad de poder compartir un proyecto científico común. Sin embargo, mucho de todo esto debe ser falso pues nuestra colaboración enseguida se llenó de aprecio mutuo, reconocimiento profesional y amistad sincera.

Este libro es sólo una pequeña parte de esa historia: un homenaje modesto en un libro modesto. Sus autores hemos querido dejar recogidas en él algunas de las inquietudes y propuestas que Julio deseaba que desarrollásemos sobre nuestras  $C_4$  y CAM. En unas hemos llegado más lejos, en otras el camino sólo queda apuntado. Las hay incluso que por razones imponderables no han podido ser recogidas en la obra. Pero en todas late nuestro homenaje, y con la anuencia de la Fundación Ramón Areces y el compromiso del Departamento de Publicaciones del CSIC, quedan recogidas en este libro.

Mientras escribo este epílogo me doy cuenta de que —en cierta medida— estoy escribiendo una parte del mío propio. Como muchos investigadores que han superado los sesenta años, percibo con claridad que muchas cosas que imaginé de joven no llegaré a verlas. Algunas resultaron simples ensoñaciones y el tiempo se encargó de mostrármelo, oportunamente. Pero otras no lo son. Entre estas últimas están mis convicciones de que la ciencia, siendo como es una aventura personal, en la que la curiosidad, el tesón, o la fe (*apolínea* o *dionisiaca*) reflejan bien las luces y sombras de nuestro carácter, en su manifestación pública, profesional, no puede desconocer los compromisos que la ligan con el tiempo y la sociedad.

Pocas son las iniciativas de I+D que desde el primer momento trascienden la estricta parcela en la que cada uno se mueve: los botánicos en proyectos de botánica, los fisiólogos en los propios de la fisiología, los bioquímicos en la suya y los microbiólogos en su propio micromundo. En cambio, el proyecto que

<sup>1</sup> Categorías a las que añade la de «odiseicos» (*El Quark y el Jaguar*. Barcelona, Tusquets, 1995).

enmarca este homenaje mantuvo, desde el primer momento, el propósito de llamarnos a documentar, en común, nuestros recursos  $C_4$  y CAM: analizar sus características morfológicas, histológicas, isotópicas, bioquímicas, fisiológicas, estructurales y metabólicas; pero también a abordar sus relaciones con el entorno en el que viven, y valorar su posible utilidad técnica en la mejora de las condiciones agrarias, forestales, pascícolas y medioambientales de zonas altamente sometidas a estrés hídrico, despoblamiento rural y abandono agrario.

Tanto en los aspectos más básicos, como en los más transferibles a la gestión de los recursos, queda mucho camino por recorrer. Ojalá que el lector encuentre en estas páginas puntos de interés sobre los que continuar sus propias investigaciones. Por mi parte, en mi recuerdo a la figura de Julio López Gorgé, permanecerá el reconocimiento por esa voluntad personal suya, de integración, que —aunque la muerte truncó pronto— pude compartir con él en este estudio.

J. L. GONZÁLEZ REBOLLAR

# Directorio de autores

## **Juan de Dios ALCHÉ**

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.

Estación Experimental del Zaidín. CSIC.

C/ Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.

*juandedios.alche@eez.csic.es*

## **Rosario ÁLVAREZ**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.

*mrosario@us.es*

## **Carlos Santiago ANDREO**

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Universidad Nacional de Rosario.

C/ Suipacha 531, 2000. Rosario. Argentina.

*carlosandreo@cefobi-conicet.gov.ar*

## **Juan de Dios BARAJAS**

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas.

Estación Experimental del Zaidín. CSIC.

C/ Profesor Albareda, 1. 18008. Granada. España.

*juan.de.barajas@fundp.ac.be*

## **Juan A. CARDOSO**

Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos.

Estación Experimental del Zaidín. CSIC.

C/Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.

*juanandres.cardoso@eez.csic.es*

## **Bruno CAVAGNARO**

Cátedra de Fisiología Vegetal. (Departamento Ciencias Biológicas).

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

C/ Almirante Brown 500 (N5528AHB). Luján, Mendoza. Argentina.

*bcavagnaro@fca.uncu.edu.ar*

## **Roland CAZALIS**

Université de Namur

Facultés des Sciences

Département SPS/URBV

61 rue de Bruxelles. 5000 Namur. Belgique

*roland.cazalis@fundp.ac.be*

## **Ana CHUECA**

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas.

Estación Experimental del Zaidín. CSIC.

C/ Profesor Albareda 1, 18008. Granada. España.

*ana.chueca@eez.csic.es*

## **María Fabiana DRINCOVICH**

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Universidad Nacional de Rosario.

C/ Suipacha 531, 2000. Rosario. Argentina.

*drincovich@cefobi-conicet.gov.ar*

## **Cristina ECHEVARRÍA**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.

*echeva@us.es*

## **Ana Belén FERIA**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.

*anabelen@us.es*

**Jesús FERNÁNDEZ-GÁLVEZ**

Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (UGR-CSIC)  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.  
*jesus.fernandez@eez.csic.es*

**Sofía GARCÍA-MAURÍÑO**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).  
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.  
Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.  
*sgarma@us.es*

**José Luis GONZÁLEZ-REBOLLAR**

Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.  
*toza@eez.csic.es*

**Mirna HILAL**

Cátedra de Fisiología Vegetal.  
Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán.  
C/ Miguel Lillo 205 - CP 4000. San Miguel de Tucumán. Argentina.  
*fepra@csnat.unt.edu.ar*

**Eduardo T. JIMÉNEZ**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).  
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.  
Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.  
*terencio@us.es*

**M<sup>a</sup>. Valeria LARA**

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos.  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.  
C/ Suipacha 531, 2000. Rosario. Argentina.  
*lara@cefobi-conicet.gov.ar*

**Olga LASTRA**

Departamento de Química Inorgánica y Analítica.  
Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.  
Casilla 233. Santiago Chile. Chile.  
*olastra@ciq.uchile.cl*

**Arancha LEÓN**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).  
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.  
Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.  
*aranchaleon@us.es*

**M<sup>a</sup>. Dolores MINGORANCE**

Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (UGR-CSIC)  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.  
*mdmingor@eez.csic.es*

**José Antonio MONREAL**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal).  
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.  
Avenida de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla. España.  
*monreal@us.es*

**Adela OLMEDILLA**

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008. Granada. España.  
*adela.olmedilla@eez.csic.es*

**Eduardo A. PAGANO**

Departamento de Biología Aplicada y Alimentos.  
Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires  
Av. San Martín 4453, 1417. Buenos Aires. Argentina.  
*epagano@agro.uba.ar*

**Carlos PASSERA**

Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento Ciencia Biológicas.  
Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo.  
C/ Almirante Brown 500 (M5528AHB). Luján, Mendoza. Argentina.  
*cpassera@uncu.edu.ar*

**Fernando E. PRADO**

Cátedra de Fisiología Vegetal.  
Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán.

C/ Miguel Lillo 205 - CP 4000. San Miguel de Tucumán. Argentina.  
*fepra@csnat.unt.edu.ar*

#### **M<sup>a</sup>. Eugenia RAMOS**

Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*eugenia.ramos@eez.csic.es*

#### **Ana Belén ROBLES**

Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*anabelen.robles@eez.csic.es*

#### **María Isabel RODRÍGUEZ-GARCÍA**

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es*

#### **Mariana ROSA**

Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán.  
C/ Miguel Lillo 205 - CP 4000 San Miguel de Tucumán. Argentina.  
*fepra@csnat.unt.edu.ar*

#### **Jabier RUIZ-MIRAZO**

Grupo de Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*jabier.ruiz@eez.csic.es*

#### **Mariam SAHRAWY**

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda, 1. 18008 Granada. España.  
*sahrawy@eez.csic.es*

#### **Aniceto Juan SÁNCHEZ-RAYA**

Departamento de Microbiología. Metabolismo del Nitrógeno.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.

C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*juan.sanchezraya@eez.csic.es*

#### **Manuel SANTANA**

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*ana.chueca@eez.csic.es*

#### **Carmen SARTOR**

Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento Ciencias Biológicas.  
Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.  
C/ Almirante Brown 500 (M5528AHB) Luján, Mendoza. Argentina.  
*cpassera@uncu.edu.ar*

#### **Antonio Jesús SERRATO RECIO**

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda, 1. 18008 Granada. España.  
*antonio.serrato@eez.csic.es*

#### **José Ángel TRAVERSO**

Institut des Science du Vegetal.  
UPR2355-CNRS, Bt23 1 Centre National de la Recherche Scientifique.  
Avenue de la Terrasse. F-91198 Gif/Yvette cedex, France.  
*traverso@isv.cnrs-gif.fr*  
Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.  
C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada. España.  
*traverso@eez.csic.es*

#### **Ricardo A. WOLOSUK**

Instituto Leloir.  
Avenida Patricias Argentinas 435 – 1405. Buenos Aires. Argentina.  
*rwolesiuk@leloir.org.ar*

#### **Abderrakib ZAHID**

Laboratoire d'Agrophysiologie El Purgan.  
75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse cedex 3 France.  
*rcazalis@free.fr*



Este libro se terminó de imprimir el día 17 de  
noviembre de 2010, festividad de Santa  
Isabel de Hungría, en los Talleres de  
Imprenta Taravilla, S.L., Mesón  
de Paños, 6. 28013 Madrid









GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



CSIC



ISBN 978-84-00-09213-9



9 788400 109213