

**APROXIMACIÓN A LA RUTA METABÓLICA PARA LA FIJACION
DE CARBONO DE *Caliphruria subdentata* (Amaryllidaceae)
MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA
LÁMINA FOLIAR**

LESLY ENID BENAVIDES BUITRAGO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011**

**APROXIMACIÓN A LA RUTA METABÓLICA PARA LA FIJACIÓN DE
CARBONO DE *Caliphruria subdentata* (Amaryllidaceae) MEDIANTE LA
CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA LÁMINA FOLIAR**

LESLY ENID BENAVIDES BUITRAGO

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Bióloga

Director:

Oscar Darío Bermúdez Zambrano M. Sc.

Asesores:

Gerardo Andrés Torres M. Sc.
Fabio Antonio Cabezas Fajardo Ph.D..

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLÓGIA
POPAYÁN
2011**

Nota de aceptación

Director _____
Oscar Darío Bermúdez Zambrano M. Sc

Jurado _____
Nilza Velasco M. Sc.

Jurado _____
Geovany Varona M. Sc

Popayán, 03 de Febrero de 2011

DEDICATORIA

Para mi esposo Reinerio
y mi hija Dínary Alexandra...
a quienes amo con el alma.

“Porque en la vida hay cosas más grandes
que las dificultades y por la fuerza infinita del amor”

A mis padres: Nelson y Eider.

A mis hermanos: Dasier, Edinson, Claribed, Nelson, Claudia Patricia,
Liliana Andrea y Gersaín.

A mis familiares y amigos

Especialmente a mi tía Solvay por todo su apoyo.

A Maritsa por su amistad y su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

El deseo de triunfar, de alcanzar el éxito y ser siempre mejores es el motor que nos mueve en la lucha constante de crecer, de ampliar nuestros horizontes con la sabiduría que nos da el conocimiento, este es el camino mas seguro hacia el gran reino de oportunidades que la vida extiende ante nosotros.

En el arduo camino de la vida, cada acción genera una fuerza de energía que regresa a nosotros de igual manera, y en el camino del aprendizaje como en todos los demás cosechamos lo que sembramos; el trabajo constante y especialmente el deseo indeleble de ser felices y exitosos, con el constante apoyo de aquellos que nos quieren, son la base para alcanzar la meta que está al final de la etapa que con anhelo hemos emprendido. Por ello...hoy, al terminar este pasaje de mi vida deseo expresar con infinita gratitud y nobleza mis agradecimientos por toda la paciencia, la tolerancia, la comprensión y el apoyo a todos aquellos que hicieron posible su exitosa culminación.

Al alcanzar la cumbre, con la satisfacción del deber cumplido, le pido a Dios me brinde la sabiduría necesaria para continuar con disciplina y principios, para ser una persona integral y saber aprovechar las fuerzas de la armonía, la alegría y el amor porque solo así podemos crear éxito.

A todas las personas que estuvieron conmigo apoyándome siempre con su sabiduría, su amistad y su amor...

“MIL GRACIAS”

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
2 MARCO REFERENCIAL	15
2.1 CARACRTÍSTICAS GENERALES DE <i>C. subedentata</i>	15
2.1.1 Actividad biológica de metabolitos secundarios producidos por <i>C. subedentata</i>	16
2.2 RUTAS METABÓLICAS PARA LA FIJACION DE CARBONO EN PLANTAS	16
2.2.1 Ruta metabólica C ₃	17
2.2.2 Ruta metabólica C ₄	17
2.2.3 Ruta metabólica intermedia C ₃ -C ₄	18
2.3 VARIACIONES EN ANATOMIA FOLIAR	19
2.3.1 Anatomía foliar en plantas C ₃	19
2.3.2 Anatomía foliar en plantas C ₄	19
2.3.3 Anatomía foliar en plantas intermedias C ₃ -C ₄	20
2.3.4 Anatomía foliar de los géneros <i>Caliphruria</i> y <i>Eucharis</i>	20
2.4 LOS CLOROPLASTOS.....	23

	.pág
2.4.1 Características generales.....	23
2.4.2 Cloroplastos en plantas C ₃	23
2.4.3 Cloroplastos en plantas C ₄	23
2.4.4 Cloroplastos en plantas C ₃ -C ₄	24
3 MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	25
3.2 ANATOMIA FOLIAR Y ULTRA-ESTRUCTURA DE CLOROPLASTOS.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
4.1 ANATOMIA DE LA LAMINA FOLIAR DE <i>Caliphruria subedentata</i>	27
4.2 ULTRAESTRUCTURA DE LOS CLOROPLASTOS DE <i>Caliphruria subedentata</i>	31
4.3 RELACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRA-ESTRUCTURALES.....	34
4.3.1. Relaciones estructurales.....	34
4.3.1.1 Lámina foliar.....	34
Tejido mesofílico.....	37
Vaina del haz vascular.....	38
Distancias intervenales.....	39
Espacios intercelulares.....	40
4.3.1.2 Otras consideraciones.....	41
4.3.2 Relaciones ultra-estructurales.....	43
4.3.3 Consideraciones finales.....	51

5.	CONCLUSIONES.....	52
6.	RECOMENDACIONES.....	53
	BIBLIOGRAFIA.....	54

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Morfología vegetativa de <i>C.subedentata</i>	15
Figura 2 Cortes transversales de hoja de <i>C. subedentata</i>	30
Figura 3 Cloroplastos de parénquima en empalizada de <i>C. subedentata</i>	31
Figura 4 Cloroplastos de parénquima esponjoso de <i>C. subedentata</i>	32
Figura 5 Cloroplastos de corona vascular de <i>C. subedentata</i>	33
Figura 6 Secciones transversales de lámina foliar de <i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. esculenta</i> y <i>C. subedentata</i>	36
Figura 7 Corona vascular de <i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. esculenta</i> y <i>C. subedentata</i>	39
Figura 8 Micrografías electrónicas de cloroplastos de <i>Z. mays</i>	44
Figura 9 Micrografías electrónicas de cloroplastos de <i>P. vulgaris</i>	45
Figura 10 Micrografías electrónicas de cloroplastos de <i>M. esculenta</i>	47
Figura 11 Micrografías electrónicas de cloroplastos de <i>C. subedentata</i>	48
Figura 12 Comparaciones estructurales de la organización tilacoidal de cloroplastos de <i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. esculenta</i> y <i>C. subedentata</i>	49

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1 Variaciones en anatomía foliar de diferentes vías metabólicas para la fijación de carbono en plantas.....	22
Cuadro 2 Procedimiento "Spurr" para el procesamiento de muestras de <i>C. subdentata</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> y <i>M. esculenta</i> para la observación de la anatomía foliar y la ultraestructura de los cloroplastos.....	26
Cuadro 3 Características anatómicas foliares de plantas con diferentes rutas metabólicas para la fijación de carbono comparadas con <i>C. subdentata</i>	35

RESUMEN

Caliphruria subedentata (Amaryllidaceae), es una especie endémica de los Andes Colombianos, cuya importancia radica en la producción de metabolitos secundarios alcaloídicos los cuales se encuentran en toda la planta entre ellos galantamina, un alcaloide de importante actividad biológica. En el presente estudio se describe por primera vez la estructura anatómica de su lámina foliar y la ultraestructura de sus cloroplastos con el fin de obtener información que permita una aproximación a la ruta de fijación de carbono de esta planta.

La descripción proviene de una muestra de diez individuos de los que se hicieron cortes transversales de cinco zonas de la hoja las cuales fueron fijadas e incluidas en resina de acuerdo al protocolo para el procesamiento de muestras vegetales y cortadas en ultramicrotomo para su observación al Microscopio Óptico de Alta Resolución (MOAR) y Microscopio Electrónico de Transmisión (MET). El corte de la hoja permitió la identificación de la cutícula, la epidermis superior uniestratificada desprovista de tricomas, con estomas distribuidos abaxialmente. El mesófilo presenta una constitución celular con parénquima en empalizada no muy definido, ya que sus células no poseen forma típica alargada, sin embargo es clara la presencia de cloroplastos ubicados sobre la superficie de la membrana plasmática, en mayor número que en las células que conforman el parénquima esponjoso, siendo así una planta con anatomía foliar dorsiventral. Las micrografías electrónicas revelan que *C. subedentata* tiene cloroplastos granales tanto en el mesófilo como en los cloroplastos de las células de la corona vascular,

La anatomía observada en cortes transversales de hoja de *C. subedentata* muestra que esta planta tiene rasgos particulares, los cuales no presentan una marcada similitud con plantas como *Zea mays*, *Manihot esculenta* o *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, los resultados muestran que tiene características anatómicas que se asemejan más a las plantas C_3 que a las C_3-C_4 y/o C_4 ; por lo que se propone a *C. subedentata* como una especie que posiblemente realiza la fijación de carbono por la vía fotosintética C_3 .

Palabras clave: *C. subedentata*, rutas metabólicas, anatomía foliar, cloroplastos.

ABSTRACT

Caliphruria subedentata belongs to Amaryllidaceae family and is an endemic species from the Andean mountains. This species produces secondary metabolites such as galantamine, which is an important biological alkaloid. This study describes, for the first time, the anatomic structure of the *Caliphruria subedentata*'s leaf and the ultra structure of its chloroplasts. Therefore, this research will contribute to identify the fixation route of carbon in this species.

In order to make the study, ten individuals of *C. subedentata* were collected. Consequently, transversal sections in five areas of the leaf were made, which were set and submerged in resin according to the protocol for vegetal samples. These sections were also cut by ultramicrotome in order to watch them in High Resolution Optical Microscope and Transmission Electron Microscopy. The structures identified with the sample were the cuticle and the superior monostratified epidermis with abaxial stomata, but not trichomes. The mesophyll has a not well defined palisade parenchyma because its cells don't have typical elongated shape; however, there are more chloroplasts on the plasma membrane than in those cells with spongy parenchyma. For this reason, *C. subedentata* is a species with dorsiventral leaf anatomy. The electronic micrographs show that *C. subedentata* has granal chloroplasts in both the mesophyll and the chloroplasts of the cells in the vascular ring.

The anatomy observed in the transversal sections of the leaf of *C. subedentata* shows that this species has special features, which are not similar to species such as *Zea mays*, *Manihot esculenta* o *Phaseolus vulgaris*. Nevertheless, the results confirm that the anatomic characteristics of *C. subedentata* are more similar to C₃ plants than C₃-C₄ and C₄. Therefore, *C. subedentata* is a species that very likely does carbon fixation for C₃ photosynthetic route.

Keywords: *C. subedentata*, metabolic pathways, leaf anatomy, chloroplast.

INTRODUCCIÓN

Las Amaryllidaceas constituyen una familia botánica de plantas bulbosas ampliamente distribuida en la región del Cauca y Valle del Cauca, contando con poblaciones representativas de los géneros *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Eucharis*, *Phaedranassa* y *Caliphruria*; este último considerado en vía de extinción (Calderón, 2003), lo que hace que sea necesario buscar estrategias para su conservación.

El género *Caliphruria* y otros géneros dentro de la familia Amaryllidaceae, han revelado gran interés por la producción de metabolitos alcaloídicos tipo isoquinolina característicos para la familia, encontrados en estudios fitoquímicos. Entre ellos es de resaltar la importancia del alcaloide galantamina, el cual presenta un gran valor por su actividad biológica, usado en farmacología como principio activo en los medicamentos para la Enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas (Cabezas, 2002)

Caliphruria subedentata una especie representativa de este género la cual constituye un endemismo para los Andes Colombianos (Meerow, 1989), es una planta que pese a su importancia no cuenta con estudios que suministren información sobre su biología y comportamiento; aunque si ha sido objeto de estudios para la caracterización de su contenido de compuestos químicos (metabolitos secundarios); y aunque esto es de gran importancia, se hace también indispensable el conocimiento integral de toda su biología.

El estudio de un organismo involucra diversos campos investigativos como la taxonomía y la citología, aspectos que son muy importantes y ampliamente utilizados en investigación; así mismo, son elementales los estudios morfológicos, anatómicos y fisiológicos para cualquier especie incluidas las especies vegetales. Las diferencias en el mecanismo de asimilación de carbono llevan asociadas algunas modificaciones anatómicas y morfológicas que sirven como complemento para que la planta desarrolle su función eficientemente. Esto ha creado una relación entre la anatomía y la fisiología que las ha llevado a que sean ramas complementarias de estudio. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las características anatómicas de las especies no deben ser consideradas como un criterio único en la determinación de rutas metabólicas seguidas para la asimilación de carbono, ya que, en algunos casos puede reflejarse en forma nítida el tipo fotosintético de la especie, pero en otros las diferentes características pueden no ser tan claras; por lo que el corte anatómico solo permite hacer

aproximaciones en relación con la vía fotosintética usada por una planta (Prasada Rao y Rajendrudu, 2007).

Sobre la estructura de la hoja de *C. subdentata* son casi nulos los trabajos reportados a excepción de Meerow (1989); y con respecto al comportamiento fotosintético no se encuentra información que permita clasificarla dentro de las rutas metabólicas para la fijación de carbono conocidas; por esta razón, y teniendo en cuenta que la hoja es el órgano en que se realiza la fotosíntesis, proceso fundamental para la productividad de toda especie vegetal, la presente investigación tuvo como propósito conocer la anatomía foliar y relacionar la histología del tejido fotosintético de *C. subdentata* y la ultraestructura de sus cloroplastos con la estructura típica en las plantas con las rutas metabólicas C_3 (*Phaseolus vulgaris*), C_4 (*Zea mays*) y/o C_3 - C_4 (*Manihot esculenta*) para hacer una aproximación a la ruta metabólica seguida por esta planta para la fijación de carbono.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Ubicar aproximadamente la ruta metabólica para la fijación de carbono de *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) según estudio histológico de la lámina foliar.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir la organización estructural de la lamina foliar de *Caliphruria subedentata* a nivel de mesófilo.
- Describir la ultraestructura de los cloroplastos de *Caliphruria subedentata*.
- Caracterizar la ruta metabólica empleada por *C. subedentata* en el proceso de fijación de CO₂ con base en la organización histológica y la ultraestructura de los cloroplastos.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Caliphruria subdentata*

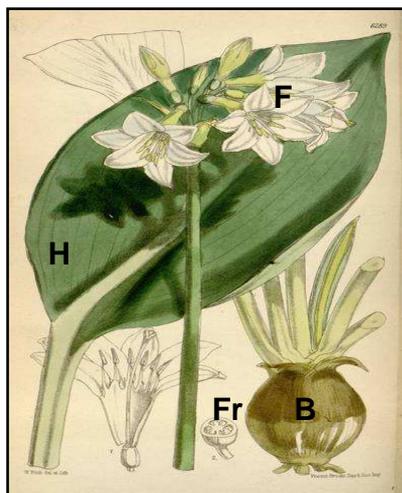
Caliphruria subdentata es una especie herbácea, perenne y bulbosa, con flores blancas acampanadas y hojas pecioladas (figura 1) perteneciente a la familia Amaryllidaceae, adaptada a condiciones de baja luminosidad y alta humedad relativa. Todas las especies de *Caliphruria* muestran una alta especificidad hacia el bosque primario, y los cambios bruscos en el dosel son catastróficos para estas plantas. En sitios recientemente clareados del bosque los bulbos persisten por algunas estaciones pero las hojas desarrolladas en condiciones de alta luminosidad muestran clorosis y necrosis. La mayoría de las colecciones de *Caliphruria subdentata* eran del valle del río Cauca al occidente colombiano y representa un endemismo para los Andes Colombianos; *C. subdentata* ha sido colectada principalmente en el valle del río Cauca al occidente colombiano en sitios cercanos a los 1000 m.s.n.m.; infortunadamente esta es ahora en gran parte un área deforestada y hacia Julio de 1984 ya no era posible encontrar los miembros de la especie en sus localidades habituales (Meerow, 1989).

Además, *C. subdentata* es conocida por la producción de metabolitos secundarios de tipo alcaloídico como galantamina (Cabezas, 2002). En la actualidad se halla amenazada de extinción según las listas rojas preliminares de plantas vasculares de Colombia (Calderón, 2003), por lo cual es importante buscar estrategias para su propagación y conservación.

Según Meerow (1989), *C. subdentata* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Asparagales
Familia: Amaryllidaceae
Tribu: Eucarideae
Género: *Caliphruria*
Especie: *C. subdentata*

Figura 1: Morfología vegetativa de *C. subdentata*: hoja (H), bulbo (B) flores (F) y fruto (Fr). Tomado de Dalton, *et al.* 1877.



2.1.1 Actividad biológica de *C. subedentata*. A nivel etnobotánico *C. subedentata*, se usa en la región andina central de Colombia, en forma de emplastos para tratar afecciones de laringe y faringe. El extracto etanólico total muestra una marcada actividad citotóxica y una baja genotoxicidad en linfocitos humanos, resultados que pueden indicar un potencial uso de esta planta como agente anticancerígeno (Cabezas, *et al* 2007).

Galantamina, alcaloide aislado de *C. subedentata* y otras especies de Amaryllidaceas, es útil como inhibidor enzimático, analgésico, anticonvulsivo, hipotensivo y citotóxico (Cabezas, *et al* 2007). Hoy en día existen diversas patentes sobre galantamina, referentes especialmente a su utilización como agente terapéutico destinado al tratamiento del alcoholismo, tratamiento de las formas espásticas de parálisis cerebral infantil y al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Esta última es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del cerebro que tiene una importante repercusión en la sociedad actual, haciendo muy importante el uso de fármacos como los derivados de galantamina para la mejoría de los pacientes (Cabezas, 2002).

2.2 RUTAS METABÓLICAS PARA LA FIJACIÓN DE CARBONO EN PLANTAS

Las hojas son órganos especializados en interceptar la luz necesaria para realizar la actividad fotosintética, para realizar esta actividad, los pigmentos presentes en los cloroplastos captan la energía solar, mientras que los haces vasculares complementan el abastecimiento de agua, y los poros estomáticos capturan el CO₂. (Medina *et al.*, 2008). La fotosíntesis en las plantas vasculares es un proceso dependiente de la luz el cual fija CO₂ en carbohidratos usando la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) como parte del ciclo de Calvin. El uso de esta enzima en la fotosíntesis es universal en todo el reino de las plantas y la fuente de CO₂ es básicamente la atmósfera. Sin embargo, la ruta a través de la cual el CO₂ llega a la ribulosa 1, 5 difosfato (RuDP) puede variar entre tipos de plantas (Furbank y Foyer, 1988).

Las plantas vasculares no suculentas están divididas en dos grupos basados en sus mecanismos de asimilación de CO₂: plantas C₃ y C₄; cada grupo es distinguido por varias características bioquímicas, fisiológicas, anatómicas y ecológicas. Además, están aquellas especies que presentan características intermedias en el proceso de asimilación de carbono y las cuales componen el grupo de plantas con fijación intermedia C₃-C₄ (Monson *et al*, 1984).

Las plantas C_3 fijan el CO_2 solamente por la acción de RuBisCo y está limitado por el contenido de CO_2 atmosférico (340 ppm). Las plantas C_4 usan la enzima fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa para fijar CO_2 atmosférico en ácidos de cuatro carbonos los cuales son luego descarboxilados para abastecer de CO_2 a la RuDP por mediación de la enzima RuBisCo (Furbank y Foyer, 1988).

2.2.1 Ruta metabólica C_3 . En las plantas C_3 el CO_2 es asimilado en un solo tipo de células, las células del mesófilo; en donde se encuentra la enzima RuBisCo. En este ciclo fotosintético, una vez el CO_2 incide en la hoja, este es difundido de los espacios intercelulares aéreos a los sitios de carboxilación en los cloroplastos; ahí es aceptado por la Ribulosa 1, 5 difosfato (RuDP) que a través de una reacción mediada por la enzima RuBisCO genera dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) las cuales, luego se reducen y producen triosas base para la formación de carbohidratos que luego dan inicio a la regeneración del aceptor RuDP. Luego que el CO_2 es incorporado, el ácido 3-fosfoglicérico (PGA) es el primer compuesto estable, donde dos moléculas pueden dar lugar a la formación de glúcidos, lípidos, aminoácidos y luego a proteínas. A esto precede una serie de reducciones en las cuales el PGA se metaboliza finalmente a compuestos de cinco carbonos en presencia de ATP y NADPH (Solari, *et al*, 2004).

2.2.2 Ruta metabólica C_4 . Barreras como la apertura estomática limitan el flujo de CO_2 hacia la RuDP, ya que en ambientes calidos, áridos y/o semiáridos mantener los estomas abiertos tiene un costo en perdida de agua por transpiración. Esto ha llevado a que plantas que habitan estas zonas hayan desarrollado un sistema que les permite fijar inicial y rápidamente el CO_2 en fosfoenolpiruvato (PEP), en una reacción catalizada por la enzima PEP-carboxilasa para dar oxalacetato en las células del mesófilo, proceso que constituye la etapa inicial de esta ruta (Barcelo, *et al*, 1998), el oxalacetato es transformado en ácido málico y aspártico en estas mismas células para luego ser liberados en el entorno de la RuDP en las células de la vaina (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

La alta eficiencia del sistema fotosintético C_4 está correlacionada con la anatomía Kranz de las hojas, organización que le ha permitido a estas plantas hacer un uso mas eficiente del agua (Nelson y Langdale, 1989), y requiere la cooperación metabólica del mesófilo de la hoja y de las células de la vaina de los haces vasculares.. La enzima RuBisCo está restringida a las células especializadas de las vainas vasculares; así, la fase de carboxilación en la ruta C_4 ocurre en las células del mesófilo y produce ácidos C_4 , los cuales luego difunden rápidamente a las células vecinas de las vainas vasculares. Allí, se realiza la descarboxilación de los ácidos C_4 transformandose en piruvato con liberación de una molécula de CO_2 que produce azúcares por la vía del ciclo de reducción del carbono (Barcelo, *et al*, 1998). Estas reacciones hacen que el CO_2 sea concentrado en las células de las

vainas perivasculares. Finalmente, se da el regreso a las células del mesófilo del ácido C₃ (piruvato o alanina) formado por descarboxilación de los ácidos C₄, y la regeneración del aceptor de CO₂ PEP (Furbank y Foyer, 1988 y Leegood, 2002).

En las plantas C₄, hay una separación espacial de la asimilación del CO₂: captación inicial del CO₂ en el mesófilo y la posterior realización del ciclo de Calvin-Benson en las células de la vaina; esto incrementa la eficiencia fotosintética y reduce drásticamente (casi nula) la actividad fotorrespiratoria (Furbank y Foyer, 1988).

2.2.3 Ruta metabólica intermedia C₃-C₄. La vía fotosintética C₃ se ha sugerido como el precursor filogenético de la ruta C₄ (Monson *et al*, 1984). Efectivamente, varios géneros contienen plantas con características fotosintéticas intermedias para los tipos C₃ y C₄; tales como *Flaveria* (Asteraceae), *Mollugo* (Aizoaceae), *Moricandia* (Cruciferae), y *Panicum* (Poaceae) según lo reportan Azcón-Bieto y Talón, 2003; Brown y Hattersley, 1989.

Estas plantas intermedias muestran menos pérdida de CO₂ por fotorrespiración comparado con las plantas C₃. Tal vez las especies intermedias poseen un limitado ciclo C₄, concentrando CO₂ en las células de las vainas vasculares. En este caso, como en las plantas C₄, la proporción CO₂/O₂ puede ser incrementada en las células de la vaina reduciendo la oxigenación RuDP, la síntesis de glicolato, y la consecuente reducción en la pérdida de CO₂ por fotorrespiración en relación con las plantas C₃. La evolución de las especies C₄ indudablemente involucra pasos en los cuales las características anatómicas están entre especies intermedias. Aunque las especies intermedias han sido caracterizadas principalmente por intercambio de CO₂ y análisis bioquímicos, ellas también pueden tener características anatómicas entre especies C₃ y C₄ (Brown y Hattersley, 1989).

El género *Panicum* ha sido de mucha utilidad en el estudio de la definición de los mecanismos fotosintéticos, ya que cuenta con especies C₃, especies C₄ y además con "híbridos" C₃ y C₄. *Panicum milioides*, planta perteneciente a este género, es la especie intermedia estudiada con mas detalle encontrando que la anatomía de sus hojas posee características intermedias entre hojas de plantas C₃ y C₄ típicas, la inhibición de la fotosíntesis por el O₂ y tasas de fotorrespiración son menores que las observadas en plantas C₃ típicas, y la actividad de las enzimas asociadas con el ciclo C₄ es de sólo un 15-30% de lo observado en plantas C₄ típicas (Ascencio, 1982). Aunque en *Panicum milioides* están presentes todas las enzimas del ciclo C₄ incluyéndose la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, que se localiza en las células del mesófilo, y la NAD-enzima málica en la vaina vascular,

la compartimentación, característica asociada al metabolismo C_4 , no es tan nítida ya que el ciclo de Calvin se efectúa tanto en las células del mesófilo como en las células de la vaina vascular (Ascencio, 1982).

2.3 VARIACIONES EN ANATOMÍA FOLIAR

2.3.1 Anatomía foliar en plantas C_3 . En las plantas C_3 , al igual que en todas las plantas, tejido fotosintéticamente activo está localizado entre la epidermis superior e inferior y contiene un gran número de cloroplastos en el mesófilo. Está formado por el parénquima, diferenciado en parénquima en empalizada y parénquima esponjoso; y los espacios intercelulares. Las células de empalizada son alargadas, dispuestas en una o dos hileras y localizadas en la cara adaxial de la hoja. El parénquima esponjoso está constituido por células de formas variadas (irregulares) formando una red tridimensional (Paz, 1995).

Las medidas de las distancias intervenales en gramíneas C_3 y C_4 han mostrado una característica anatómica adicional, las especies con la vía C_4 tienen menos células entre las vainas vasculares de la hoja que las especies C_3 (Byott, 1976). Por término medio, en plantas C_3 , se cuentan de 9 a 15 células entre haces vasculares (Azcón-Bieto y Talón, 2003). Las especies C_3 típicas presentan una vaina poco desarrollada, prácticamente sin cloroplastos y mitocondrias (Monson *et al*, 1984).

2.3.2 Anatomía foliar en plantas C_4 . La anatomía de las plantas C_4 difiere mucho de la de las plantas C_3 . En las plantas C_4 se ha desarrollado una anatomía particular del mesófilo conocida como anatomía Kranz: disposición ordenada de las células del mesófilo con relación a la vaina del haz, formando capas concéntricas alrededor de este; o sea, en lugar de formar el parénquima en empalizada y lagunar como en las especies C_3 , las células del parénquima lagunar se asocian alrededor de los haces vasculares formando una vaina espesa de células clorofílicas grandes con cloroplastos dispuestos en la periferia y con paredes atravesadas por una gran cantidad de plasmodesmos que comunican las células de la vaina perivascular y las del mesófilo; en contraste con las células de esta vaina las células del mesófilo tienen espacios intercelulares (Becerra de Lozano, *et al* 2002, Azcón - Bieto y Talón, 2003 y Ueno y Sentoku, 2006). Las especies C_4 presentan una proporción celular ocupada por cloroplastos y otros organelos considerablemente mayor en las vainas vasculares que especies C_3 y C_3 - C_4 , exhibiendo vainas ricas en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Monson *et al*, 1984 y Ueno *et al*. 2006).

2.3.3 Anatomía foliar en plantas intermedias C₃-C₄. Este tipo de plantas presenta una anatomía foliar intermedia con respecto a las C₃ y C₄ típicas. Se caracterizan por la presencia de un parénquima en empalizada en posición adaxial y el parénquima esponjoso en posición abaxial. Las células alargadas del parénquima en empalizada muestran numerosos cloroplastos con abundantes inclusiones de almidón. La corona vascular se haya desplazada hacia la región abaxial y los espacios intercelulares son abundantes (Paz, 1995).

Panicum milioides es una especie intermedia típica cuya anatomía foliar ha sido estudiada detalladamente. En esta planta existe una vaina vascular caracterizada por la presencia de abundantes organelos, tal como ocurre en hojas de especies C₄, no es una vaina poco desarrollada sin cloroplastos y mitocondrias como en las especies C₃ típicas, pero tampoco presenta el número elevado de cloroplastos de las células de especies C₄. Por otra parte, existe una organización radial de las células del mesófilo alrededor de la vaina vascular (característica C₄) además una menor distancia y número de células entre los haces vasculares de la hoja que el que se observa en hojas de plantas C₃. También presenta disposición centrípeta de cloroplastos y otros organelos en las células de la vaina vascular, muy similar a lo que se encuentra en hojas de especies C₄ del tipo NAD-enzima málica. En las especies intermedias de *Panicum*, *Moricandia* y especies intermedias de *Flaveria*, los numerosos cloroplastos están organizados en posición centrípeta en las células de las vainas vasculares. La proporción de células de las coronas vasculares ocupadas por cloroplastos y otros organelos es, sin embargo, considerablemente menor en especies intermedias que en especies C₄ (Monson *et al*, 1984).

Así mismo, las distancias intervenales en las hojas de pastos C₄ son mucho más cortas que en pastos C₃. La distancia intervenal y el número de células del mesófilo entre venas en las hojas de especies intermedias como *P. milioides* son intermedias entre pastos C₃ y C₄ (Monson *et al*, 1984).

En el Cuadro 1 se sintetizan las características generales de la anatomía foliar de plantas C₃, C₄ y C₃-C₄.

2.3.4 Anatomía foliar de los géneros *Caliphruria* y *Eucharis*. Meerow (1989), quien ha estudiado ampliamente las Amaryllidaceas; describe la anatomía foliar de estos dos géneros de esta familia de manera conjunta, siendo esta la única descripción reportada en la literatura:

“Es evidente una capa no muy definida de empalizada, aunque la ausencia de este tejido es característico en algunas especies. El mesófilo consiste en varias

capas de clorénquima tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja, y una gruesa región de tejido esponjoso, ligeramente aerenquimatoso. Por debajo de los estomas aparecen regularmente pequeñas cavidades aéreas; los haces vasculares están encerrados por una vaina de una o dos capas de células parenquimatosas. Los únicos elementos del xilema presente son traqueidas con engrosamiento anular.”

Cuadro 1: Características de la anatomía foliar en plantas con diferentes vías metabólicas para la fijación de carbono

Plantas C₃	Plantas C₄	Plantas C₃-C₄
Carecen de anatomía Kranz. Muy pobre en organelos celulares	Presentan anatomía Kranz. Vaina vascular rica en organelos celulares.	Presentan anatomía intermedia, con vaina vascular rica en organelos pero < en plantas C ₄ .
Mesófilo diferenciado en parénquima esponjoso y empalizada.	Mesófilo no diferenciado en parénquima esponjoso y empalizada.	Mesófilo diferenciado en parénquima esponjoso y empalizada.
Parénquima esponjoso formado por células de forma irregular, formando una red, con pocos cloroplastos.	Células mesofílicas dispuestas en forma radial alrededor de la vaina vascular.	Células del mesófilo dispuestas en forma radial alrededor de la vaina vascular.
Parénquima en empalizada dispuesto en 1 o 2 hileras de células	Sin parénquima en empalizada	Parénquima en empalizada dispuesto en una hilera de células.
Menor área celular ocupada por cloroplastos.	Mayor área celular ocupada por cloroplastos	Área células ocupada por cloroplastos intermedia entre C ₃ y C ₄
Distancias intervenales grandes y mayor número de células entre venas.	Distancias intervenales cortas, los haces vasculares se presentan bien juntos	Distancias intervenales intermedias entre plantas C ₃ y C ₄ .
Cloroplastos de un solo tipo y del mismo tamaño en mesófilo y corona vascular.	Cloroplastos dimórficos: granales en mesófilo y agranales y mas grandes en corona perivascular.	Cloroplastos granales en mesófilo y corona perivascular, pero mas abundantes en esta última.

*Elaborado por el autor con base en Paz, 1995; Becerra de Lozano, *et al*, 2002.

2.4 LOS CLOROPLASTOS

2.4.1 Características generales. Los cloroplastos son orgánulos de las células vegetales, son generalmente grandes (1-10 μ). Su forma es variable, desde esférica o elíptica a mucho más compleja asemejando cintas. Forman parte de un conjunto de orgánulos denominados plastidios o plastos; estos, poseen en su interior ADN, el cual ha conservado unos 250 genes de su ancestro bacteriano que codifican para ARN ribosómico, ARN de transferencia, proteínas para la multiplicación y para la realización de la fotosíntesis. Este organelo está rodeado por una envoltura formada por dos membranas lisas y continuas separadas por un espacio intermedio. El estroma es una matriz más o menos granular, en ella se produce la fijación del CO₂ así como también la síntesis de azúcares, almidón, ácidos grasos y algunas proteínas. En el interior del cloroplasto se encuentran otras estructuras laminares a manera de vesículas aplanadas conocida como tilacoides que forman un complejo sistema de membranas, regionalmente diferenciado en lamelas que atraviesan el estroma y en ocasiones forman pilas de discos aplanados, los grana. En la membrana de los tilacoides se encuentran las moléculas de los pigmentos (clorofilas) y transportadores electrónicos, que efectúan la captación de luz y la transferencia de energía durante el proceso fotosintético. Los cloroplastos por medio del proceso de la fotosíntesis producen el oxígeno y la mayor parte de la energía química que es utilizada por los organismos vivientes (Gunning, 1996).

2.4.2 Cloroplastos en plantas C₃. En especies con mecanismo C₃ para la fijación de carbono, el parénquima en empalizada, esponjoso y las células de las vainas vasculares contienen cloroplastos del mismo tipo con doble membrana; en los cuales las membranas tilacoidales están apiladas dentro de un estroma homogéneo formando grana. Los cloroplastos del mesófilo y la vaina de los haces son del mismo tamaño (Becerra de Lozano, *et al* 2002).

2.4.3 Cloroplastos en plantas C₄. A nivel de cloroplastos las plantas C₄ presentan un dimorfismo característico, los cloroplastos de la vaina perivascular son mas grandes que los cloroplastos de las células del mesófilo, se ubican próximos a la pared tangencial externa o interna; presentan un retículo periférico formado a partir de la membrana interna, menos número de grana o ausencia de estos y forman granos de almidón mas grandes y numerosos que los de la células del mesófilo (Becerra de Lozano, *et al* 2002 y Gunning, 1996). Los cloroplastos de las células mesofílicas presentan apilamientos de membranas tilacoidales los cuales se encuentran bien organizados y claramente definidos (Paz, 1995). Como se observa en secciones de hoja de maíz (*Z. mays*), el xilema y el floema de cada vena está rodeado por células de la vaina del haz, y estas por células del mesófilo. Las pilas tilacoidales son claramente observadas en los cloroplastos del mesófilo.

Las células del mesófilo contienen cloroplastos normales con abundantes discos tilacoidales apilados, lo cual les permite llevar a cabo la fase luminosa de la fotosíntesis. Las células de la vaina carecen de grana y presentan escasos tilacoides. Así, los cloroplastos de células del mesófilo contienen los dos fotosistemas, PSI y PSII, pudiendo generar ATP y NADPH, mientras que los de células de la vaina sólo contienen fotosistema I (Gunning, 1996).

2.4.4 Cloroplastos en plantas intermedias C₃-C₄. Un estudio reciente de ultraestructura de hojas en varias especies intermedias estrechamente relacionadas de *Panicum* muestra una alta asociación de cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas en las células de los haces vasculares. Además, como en las especies C₄ de panicum, los cloroplastos y mitocondrias de las células de las vainas vasculares en especies C₃-C₄ son más largos que los de las células del mesófilo. Como una anatomía inusual, secciones de hojas de *P. schenkii* han demostrado que algunas mitocondrias están completamente rodeadas por cloroplastos (Monson *et al*, 1984).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal de estudio (*Caliphruria subedentata*) para la realización del presente trabajo fué colectado en el banco de germoplasma, ubicado en el jardín botánico de la Universidad del Cauca “Alvaro Jose Negret”, vereda La Rejoya, Popayán; ubicado a 1800 m.s.n.m., temperatura promedio entre 17-19 °C, humedad relativa entre el 69-82 % y precipitación promedio de 1581 mm/año; y caracterizado taxonómicamente en el herbario de la Universidad del Cauca (Colombia).

Las plantas de las especies a utilizar como referencia *Phaseolus vulgaris* (C₃), *Zea mays* (C₄) y *Manihot esculenta* (intermedia C₃-C₄) fueron tomadas de cultivos ya establecidos en la población de Mercaderes, Cauca, localizada a 1167 m.s.n.m., con temperatura promedio de 22 °C y precipitación promedio entre 1000- 2000 mm/año (<http://mercaderes-cauca.gov.co>).

3.2 ANATOMIA FOLIAR Y ULTRAESTRUCTURA DE CLOROPLASTOS

Para el estudio anatómico y ultraestructural de *C. subedentata* se utilizaron 10 hojas adultas seleccionadas aleatoriamente de 10 plantas diferentes. Cada hoja fue muestreada en cinco (5) zonas equidistantes de la lámina, para un total de 50 muestras. De las especies de referencia (*Z. mays*, *P. vulgaris* y *M. esculenta*) se colectaron 5 muestras foliares de las mismas zonas muestreadas para *C. subedentata*, pero en una sola hoja, obteniendo 5 muestras por especie; esto a razón que son especies ampliamente estudiadas y no se hace indispensable realizar su descripción.

Todas las muestras fueron procesadas en glutaraldehído al 2 %, post-fijadas en Tetróxido de Osmio (OsO₄) al 2% e incluidas en resinas epóxicas según el protocolo establecido por Mercer y Birberk, 1974 (Cuadro 2).

Para el análisis histológico por Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) de las especies utilizadas en el estudio, se realizaron cortes transversales semifinos de 1 µm de espesor, y para el estudio de la ultraestructura de los cloroplastos por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) cortes ultrafinos de 90 nm. De este material se obtuvieron fotografías ópticas y micrografías electrónicas de las cuales

se hicieron las respectivas mediciones para formar la base de datos a la que se les realizó el análisis estadístico.

Cuadro 2. Procedimiento “Spurr” para el procesamiento de muestras de *C. subdentata*, *P. vulgaris*, *Z. mays* y *M. esculenta* para observación de la anatomía y ultraestructura de los cloroplastos.

PROCESO	TRATAMIENTO	TIEMPO
PREFIJACION	Glutaraldehido 2%	12 horas
LAVADO	Buffer fosfato de Millonig	15 minutos
POSTFIJACION	Tetraóxido de osmio 1%	1 horas
LAVADO	Buffer fosfato de Millonig	15 minutos
DESHIDRATACION	Etanol 25-90% Etanol 100% Acetona	1 hora 15 minutos 30 minutos
IMBIBICION	Resina – acetona	3 horas
POLIMERIZACION	Resina	48 horas

Según Mercer y Birberk, 1974.

Mediante el programa SPSS versión 11.5 se hicieron comparaciones de las siguientes variables para todas las especies estudiadas: grosor de la lámina foliar, tamaño de las células del parénquima en empalizada y esponjoso, porcentaje de espacios intercelulares, tamaño y número de células de la corona vascular. Teniendo en cuenta que los datos de las variables analizadas no se ajustaron a la distribución normal (Shapiro-wilk: $p > 0.05$) ni a la homogeneidad de varianzas (Levene: $p > 0.05$), el análisis comparativo se hizo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANATOMÍA DE LA LÁMINA FOLIAR DE *Caliphuria subedentata*

Observaciones microscópicas en sección transversal de lámina foliar de *Caliphuria subedentata* muestran que presenta hojas cuyo espesor oscila entre 223.19 μ en la margen y 607.98 μ hacia el centro de la hoja, con una reducción gradual del centro hasta el borde; epidermis superior uniestratificada, recubierta por cutícula y desprovista de tricomas (figura 2) con células generalmente cuadrangulares a nivel de margen, región media, ápice y base de la hoja (de 24.81- 35.87 μ de alto a 33.92 - 46.87 μ de ancho), mientras que, en la región cercana a la nervadura central estas se tornan mucho mas anchas que altas (33.05 μ de alto x 98.09 μ de ancho aprox).

En algunas de las células epidérmicas se observa la presencia de cloroplastos; característica propia de plantas que crecen en lugares con poca luz en el sotobosque, considerándose como el único tipo de plantas que posee estos organelos fotosintéticamente activos en epidermis (Becerra de Lozano *et al*, 2002 y Evert, 2006). Normalmente, las células de la epidermis foliar, excepto las células oclusivas de los estomas, no presentan cloroplastos bien desarrollados (Cortés, 1990); no obstante, Esau plantea de forma general que la epidermis foliar de plantas vasculares superiores terrestres es un tejido vivo con cloroplastos no bien diferenciados y que algunas plantas pueden llegar incluso a contener abundante clorofila en estas células.

El mesófilo presenta una constitución celular con parénquima en empalizada no muy definido, como lo refiere Meerow (1989) al describir los géneros *Eucharis* y *Caliphuria*, ya que sus células no poseen forma típica alargada sino que son casi isodiamétricas, o con tendencia a ser mas anchas que largas; razón por la cual la proporción de este tejido es reducida alcanzando un grosor de 88.62 μ a un máximo de 107.74 μ . A pesar que este tipo de células en la mayoría de plantas tienen generalmente forma de prismas alargados, la relación de longitud a anchura varía notablemente entre especies; así, la forma que presentan las de *C. subedentata* es también encontrada en otras especies vegetales como es el caso de *Taraxacum officinale* cuyas células casi isodiamétricas conservan una relación de longitud a anchura de 1:1 (Esau, 1976).

Además, en las células que conforman el parénquima en empalizada se observan cloroplastos ubicados sobre la superficie de la membrana plasmática en mayor número que en las células del parénquima esponjoso (figura 2A, 2B, 2C, 2D y 2E),

como es característico en el tejido de empalizada ya que por la disposición y forma de estas células los cloroplastos quedan en una posición mas favorable con respecto a la luz. En esta especie se mantiene una relación de cloroplastos en tejido esponjoso - empalizada de 1:2.5, siendo así una planta con anatomía foliar dorsiventral. Sus células se disponen en posición paralela a las células de la epidermis y se observan pequeños espacios intercelulares en reducido porcentaje entre ellas (aprox. 3-5 %). Este tejido consta generalmente de 1 a 2 capas de células (en margen, región media, ápice y base de la lámina), como lo muestra la figura 2A, 2B, 2D y 2E; hasta 3 capas en cercanías a la nervadura central, figura 2C; dichas células mantienen dimensiones similares en sentido horizontal de la hoja (margen hasta nervadura central) y miden 33,37 μ de alto x 41.76 μ de ancho aprox.; así mismo las zonas en sentido vertical (ápice y base) muestran células análogas entre si y mas grandes que las de las zonas horizontales, estas miden 54.98 μ de alto x 70.73 μ de ancho.

El escaso grado de desarrollo del tejido en empalizada y la baja proporción con respecto del tejido lagunar que presenta *C. subedentata* se relaciona con el hábitat en que crecen estas plantas ya que sus hojas se diferencian a baja intensidad lumínica. Esau (1976) plantea que el grado de diferenciación del mesófilo y la proporción de tejido esponjoso y empalizada varían según la especie y el hábitat. Se sabe que el acusado desarrollo del tejido en empalizada está relacionado con la xeromorfia de las especies (tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas), cuyas hojas permanecen expuestas a la luz durante su diferenciación, y en ellas el parénquima en empalizada es más desarrollado. Este fenómeno está directamente relacionado con la especialización para captar la luz, siendo el tejido en empalizada el más apto para realizar este proceso ya que debido a la disposición y forma de sus células, los cloroplastos se presentan en posición más favorable con respecto a la luz; así, estos se disponen sobre la membrana durante la fotosíntesis y las células estrechas del tipo mas común del tejido en empalizada disponen de más superficie en la membrana por lo que puede albergar mas cloroplastos en una sola capa, lo que es muy benévolo para las especies xeromórficas (Cortés, 1990 y Rudall, 2007).

El parénquima lagunar tiene un ancho total que oscila entre 199.99 μ en la zona mas delgada (margen), 326.42 μ en las zonas intermedias (región media y contiguo a la nervadura central) y 555.56 μ en las zonas mas anchas (ápice y base). En dicho espacio se encuentran de 7 a 10 capas de células (figura 2A, 2B, 2C, 2D y 2E) con formas variadas, frecuentemente alargadas paralelamente a la superficie de la hoja ubicadas en su mayoría una sobre otra semejando pilas, pero también algunas redondeadas o isodiamétricas; en el tejido lagunar las células miden de 29.44 – 38.09 μ de ancho x 52.50 – 81.45 μ de largo en la margen, región media y zona cercana a la nervadura central, (figura 2A, 2B y 2C)

y de 44.50 – 56.17 μ de ancho x 91.61 – 117.05 μ de largo en el ápice y la base de la hoja (figura 2D y 2E).

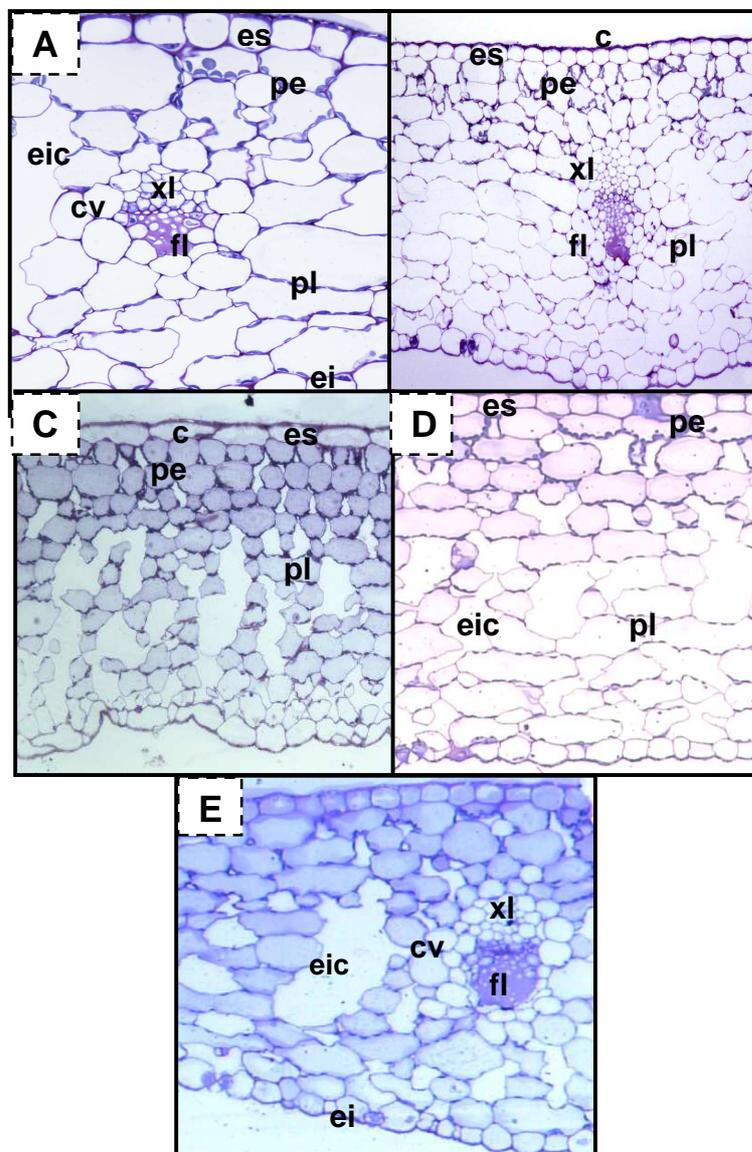
Con relación al área la proporción entre el parénquima lagunar y el parénquima en empalizada es 5:1, lo cual confirma el bajo desarrollo del tejido en empalizada en la lámina foliar de *C. subedentata*; no obstante, como en cualquier hoja con mesófilo diferenciado, la mayoría de los cloroplastos se presentan en el parénquima en empalizada como parte de su especialización para la actividad fotosintética. Su relación comparada de cloroplastos en parénquima esponjoso y en empalizada equivale 1: 2.5 como ya se había mencionado; característica que comparte con *Phaseolus multiflorus* que conserva una relación 1: 2.2 según lo reporta Esau (1976).

El tejido esponjoso presenta abundantes y grandes espacios intercelulares de forma irregular y restringidos a partes aisladas de la hoja, como lo muestran las imágenes de la figura 2. *C. subedentata* presenta aproximadamente un 21 % de espacios intercelulares en el borde, la zona media y la base de la lámina foliar, y hasta el 29 % en el ápice y la región contigua a la nervadura central; en general el 25 % del mesófilo corresponde a espacios intercelulares. Esta estructura lagunosa hace posible el completo intercambio gaseoso entre el exterior y el tejido fotosintético; ya que, debido a la magnitud del sistema intercelular del mesófilo una extensa superficie de membrana celular queda expuesta al aire intercelular (Esau, 1976). Aquí, se visualizan también pequeñas cámaras estomáticas que ocupan de una a dos capas de células del tejido lagunar y sin forma definida.

Los haces vasculares, (figura 2A y 2B) inmersos en el tejido foliar se disponen paralelamente, se muestran en la parte media del mesófilo, por debajo de las células de empalizada, el tamaño de estas estructuras oscila entre 97.91 μ de alto x 99.9 μ de ancho en la margen y el ápice, donde la lámina es mas delgada y 158.13 μ de alto x 122.68 μ de ancho en la región media, región contigua a la nervadura y base de la hoja. Están compuestos por células del xilema en posición adaxial y células floemáticas abaxialmente, encerrados por una vaina de dos capas de células parenquimáticas, una interna, denominada *vaina mestoma* (Esau, 1976), sin cloroplastos conformada por 11 a 18 células de tamaño variable de entre 0.43 mm² a 1.53 mm², además se nota una tendencia a que las células laterales sean mas grandes que las de los extremos superior e inferior; y una vaina externa compuesta por células mas grandes y homogéneas de forma redondeada en su mayoría, con cloroplastos delgados y largos. Entre haces se observan de 4 a 5 células en los mas cercanos de la margen, el ápice y la base de la hoja y hasta 10 o 12 células en las zonas media y contiguo a la nervadura central. Finalmente, en la epidermis abaxial se presentan células de forma

variable, desde rectangulares hasta redondeadas en medio de las cuales hay estomas anomocíticos (hoja hipostomática).

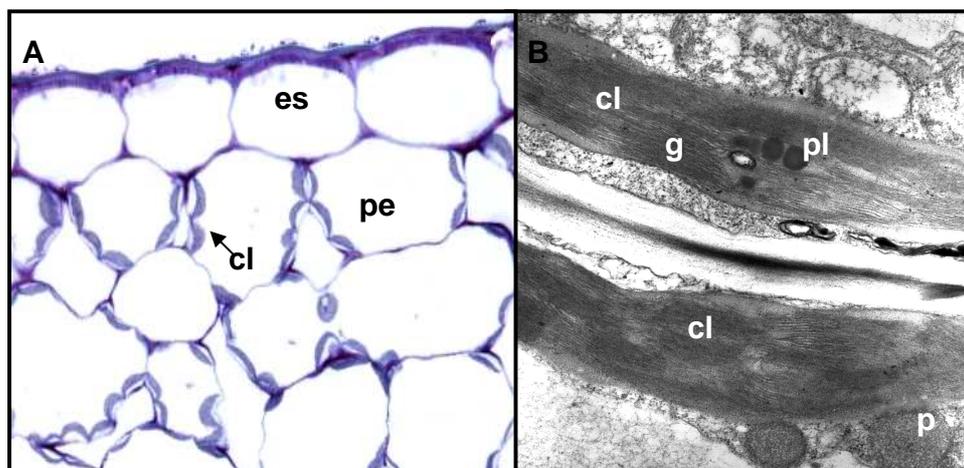
Figura 2. Cortes transversales en diferentes regiones de la hoja de *Caliphuria subedentata* observados por MOAR, así: **A.** margen (40x), **B.** región media (10X), **C.** región cercana a la nervadura central (10x), **D.** ápice (10x) y **E.** base (10x). Se puede apreciar cutícula (**c**), epidermis superior (**es**), e inferior (**ei**), parénquima en empalizada (**pe**), parénquima lagunar (**pl**), floema (**fl**), xilema (**xl**), corona vascular (**cv**), y espacio intercelular (**eic**).



4.2 ULTRAESTRUCTURA DE LOS CLOROPLASTOS DE *Caliphuria subdentata*

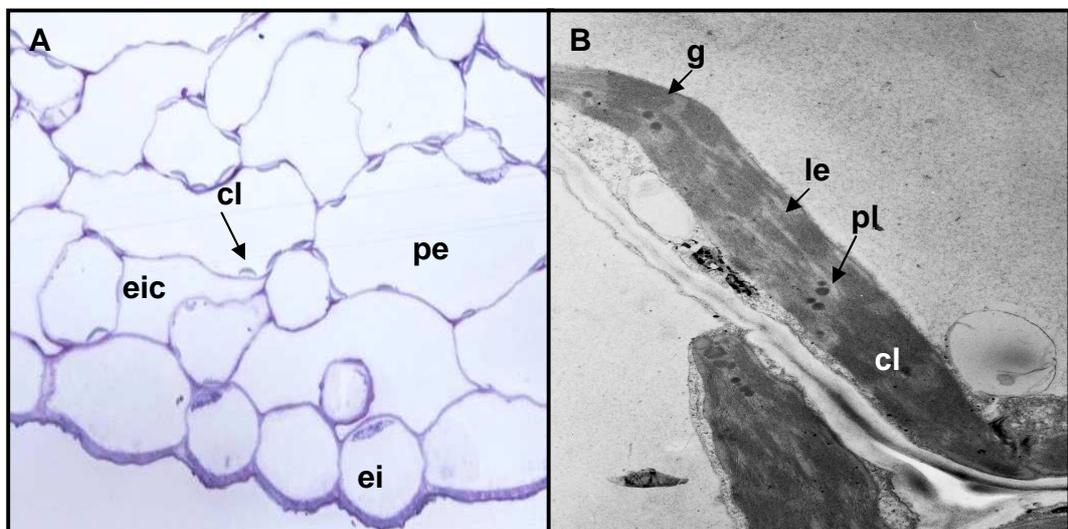
En *Caliphuria subdentata*, el parénquima en empalizada muestra cloroplastos abundantes, figura 3A; algunos ubicados en las paredes celulares (en posición centrífuga) y otros dispuestos centralmente dentro de la célula, sin inclusiones de almidón. Se observa desde 2 hasta 14 cloroplastos por célula, con un promedio general de 7; en términos de densidad hay un promedio de 1.1 cloroplastos/mm². Los cloroplastos adheridos a la membrana celular son de forma alargada con un tamaño promedio entre 4 - 5 μ de largo y 0.5 - 1 μ de ancho, mientras que los del centro tienen forma más o menos circular. A nivel interno, estos cloroplastos, figura 3B; muestran asociaciones granales de aspecto poco definido, en las que se cuentan hasta 20 láminas tilacoidales; las lámelas intertilacoidales son pequeñas y no alcanzan a distinguirse claramente. Se observa también un peroxisoma adyacente a la membrana cloroplasmática; y algunos plastoglóbulos (gotículas denso-electrónicas) inmersos en el cloroplasto, organelos celulares no delimitados por membranas y compuestos principalmente por quinonas lipofílicas, carotenoides y vitamina K, estos aumentan en número durante la época de la senescencia, así como en plantas que crecen a la sombra (Przybyl e Idzikowska, 2003), como es el caso de *C. subdentata*. Aunque en *M. esculenta* estas estructuras también se presentan pero en menor número por ser esta una especie que crece en ambientes con alta exposición solar.

Figura 3. Sección transversal de hoja de *C. subdentata* (A) observada por MOAR (40x); muestra epidermis superior (es) y parénquima en empalizada (pe) con abundantes cloroplastos (cl). Micrografía electrónica de transmisión (B) de hoja de *C. subdentata* mostrando cloroplastos (cl) de parénquima en empalizada con granas (g), peroxisoma (p) y plastoglóbulos (pl). 15000x



Las células del parénquima esponjoso presentan menor cantidad de cloroplastos que las del tejido de empalizada encontrando de 1 hasta 11 cloroplastos por célula, con una media de 6; en términos de densidad hay en promedio 0.5 cloroplastos/mm², a excepción de la zona contigua a la nervadura central en la cual se encuentran en promedio hasta 3 cloroplastos/mm². En el parénquima lagunar los cloroplastos son mucho más largos que en las células de empalizada, y en apariencia más delgados, miden entre 6 – 11 μ de largo por 0.5 – 2 μ de ancho; se encuentran ubicados en las paredes celulares. Las membranas tilacoidales, figura 4B observadas ultraestructuralmente están agrupadas en granas al igual que en el tejido de empalizada. En estos cloroplastos se aprecian hasta 18 asociaciones granales cortas y bien definidas, unidas entre si por algunas lamelas no cuantificables a la vista; de la misma manera, se observan hasta 10 pequeños plastoglóbulos inmersos en el estroma.

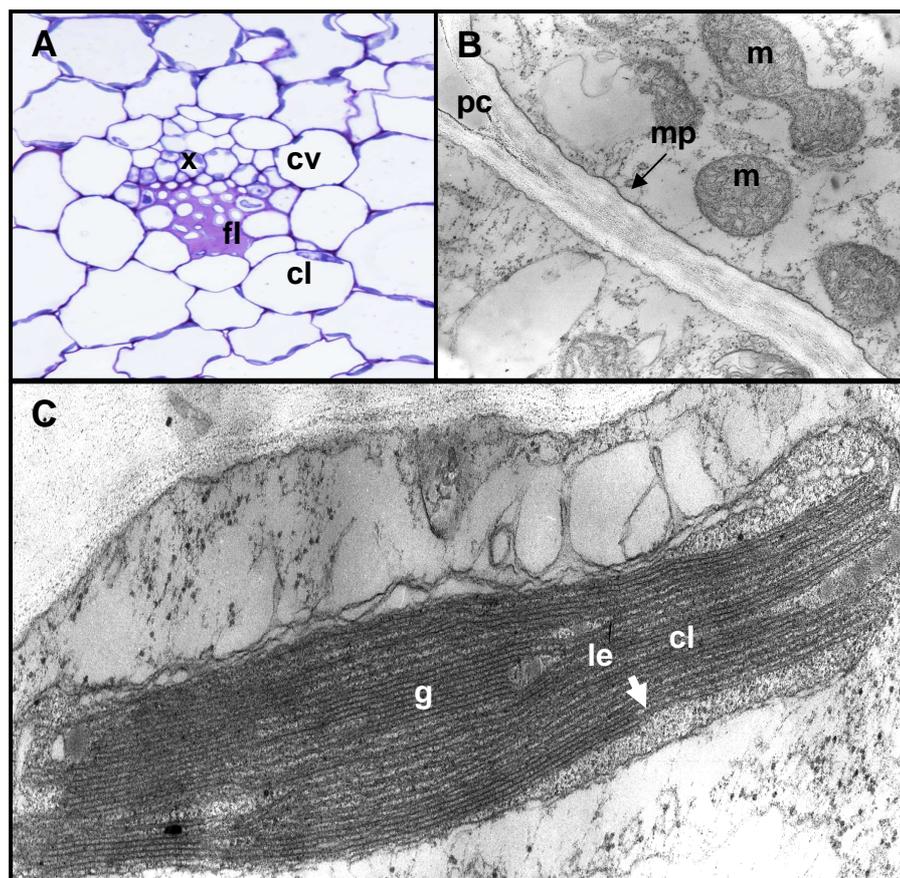
Figura 4. Sección transversal de hoja de *C. subdentata* (A) observada por MOAR (40x); muestra epidermis inferior (ei) y parénquima esponjoso (pe) con cloroplastos (cl) y espacios intercelulares (eic); y, micrografía electrónica de transmisión (B) de hoja de *C. subdentata* mostrando cloroplastos (cl) de parénquima esponjoso con granas (g), lamelas estromales (le) y plastoglóbulos (pl). 5000x



En las coronas vasculares, figura 5A; es evidente la escasez de organelos, la vaina es poco desarrollada, con muy pocos cloroplastos y mas pequeños que los de las células del mesófilo; su tamaño promedio es de 3 - 4 μ de largo por 0.5 – 1.5 μ de ancho. En la zona más cercana al haz vascular se observan células con varias mitocondrias como las observadas en la figura 5B; algunas de ellas se

hallan asociadas a los cloroplastos pero en su mayoría (hasta 8 mitocondrias) se ven dispersas en la célula. Estos cloroplastos presentan organización tilacoidal granal, pero con asociación diferente a la de los cloroplastos del mesófilo. En los cloroplastos de la vaina vascular, los grana están compuestos por membranas tilacoidales más largas de modo que pareciera no formar grana, son más escasos (aproximadamente 8 granas/cloroplasto) y están compuestos por entre 4 y 10 tilacoides, unidos por lamelas largas.

Figura 5. Sección transversal de hoja de *C. subdentata* (A) observada por MOAR (40x); muestra corona vascular (cv), floema (fl), xilema (x) y cloroplasto (cl). Micrografía electrónica de transmisión de hoja de *C. subdentata* (B) mostrando mitocondrias (m), membrana plasmática (mp) y pared celular (pc). Micrografía electrónica de transmisión de hoja de *C. subdentata* (C) mostrando cloroplasto (cl), grana (g) y lamelas estromales (le). B y C a 20000x.



4.3 RELACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES

Hoy en día es bien conocida la relación que existe entre las características morfo-anatómicas y ultraestructurales, y las vías fotosintéticas de los diferentes tipos de plantas, esto permite tener plantas típicas que sirven como referencia para el estudio de otras.

A continuación se relaciona la estructura del tejido foliar de *Caliphurria subedentata* con la de *Zea mays* (C_4), *Phaseolus vulgaris* (C_3) y *Manihot esculenta* (C_3 - C_4), especies estas representantes de diferentes vías fotosintéticas. Y a nivel de ultraestructura se discute la organización tilacoidal de los cloroplastos de *C. subedentata* respecto de las tres especies mencionadas. En el Cuadro 3 se pueden observar los valores morfométricos de ciertas características foliares para las cuatro especies.

4.3.1 Relaciones estructurales

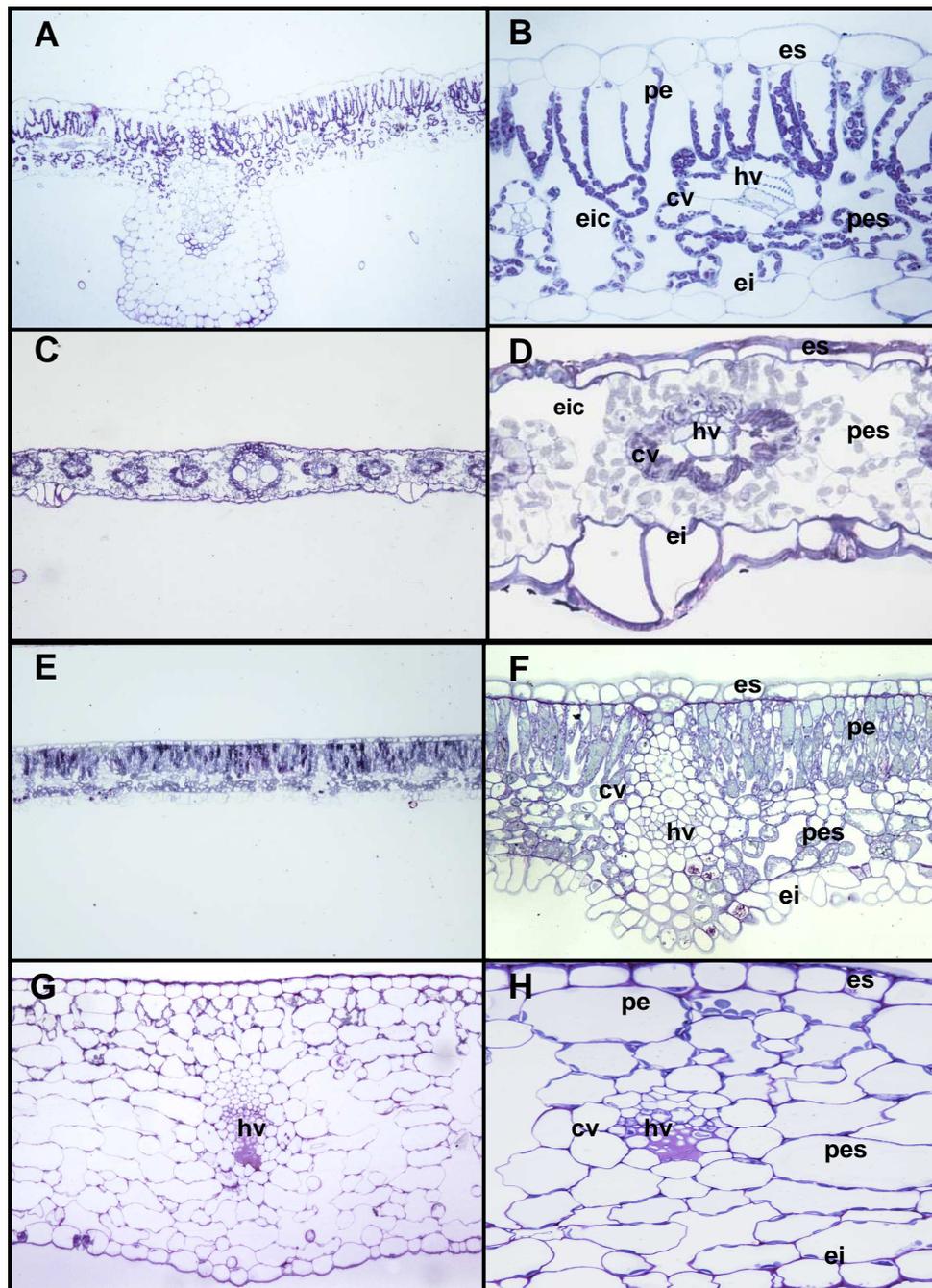
4.3.1.1. Lámina foliar. La lámina foliar de *C. subedentata* es mas gruesa (220 – 600 μ) con referencia a las otras especies estudiadas, las cuales alcanzan en general un grosor máximo de 150 μ en *P. vulgaris*, 104 μ en *Z. mays* y 99 μ en *M. esculenta*. Esta es una característica muy particular dado que *C. subedentata* posee un parénquima en empalizada compuesto por células casi isodiamétricas (no alargadas) que ocupan un espacio reducido en el mesófilo; por el contrario, en las otras especies estudiadas, este tejido es mucho mas desarrollado, exceptuando a *Z. mays*, que no posee esta característica. Además, *C. subedentata* es una especie que restringe su hábitat a lugares con condiciones de luz débil, por lo que se considera como una planta con hojas de sombra.

De acuerdo con la literatura este tipo de plantas exhibe hojas más delgadas que las de plantas desarrolladas a plena exposición solar debido a que estas últimas poseen mas capas de células en empalizada y células más largas (Azcon Bieto y Talón, 2003; Barceló, *et al.* 1998, y Opik y Rolfe, 2005). Mas sin embargo, como se puede observar en la figura 6A, 6C, 6E y 6G; en el campo visual de 10x, las diferencias son notorias, así como lo indican los valores numéricos. Pero, a diferencia de las hojas de sol *C. subedentata* no debe su grosor de lámina foliar al amplio desarrollo del tejido de empalizada, sino al desarrollo del parénquima

Cuadro 3: Características anatómicas foliares de plantas con diferentes rutas metabólicas para la fijación de carbono comparadas con *C. subdentata*.

Planta	<i>P. vulgaris</i> C ₃	<i>Z. mays</i> C ₄	<i>M. esculenta</i> C ₃ -C ₄	<i>Caliphurria subdentata</i>
Carácter				
Grosor lámina foliar	85 – 150 μ	65 -104 μ	66 - 99 μ	220 – 600 μ
Mesófilo	Parénquima lagunar y en empalizada	No diferenciado en parénqu. lagunar y empalizada	Parénquima lagunar y en empalizada bien diferenciado	Parénquima lagunar y en empalizada poco diferenciado
Células de empalizada	Alargadas (1 capa), con abundantes espacios intercelulares. 20-50 μ largo x 12-15 μ ancho	No tiene	Alargadas (2 capas), con pocos espacios intercelulares. 22-42 μ largo x 5-6.5 μ ancho	Cuadrangulares a casi mas anchas que largas. (1-3 capas). 32-56 μ largo x 40-81 μ ancho
Células lagunares	Redondeadas. 13-25 μ largo x 14-20 μ ancho	Ovaladas 13-45 μ alto x 10-95 μ ancho	Redondeadas 7.5-9.5 μ alto x 10 -12 μ ancho	Alargadas paralelas a la superficie de la hoja. 29-56 μ alto x 40-81 μ ancho.
% espacios intercelul.	29-36 %	16–24 %	8-14 %	18-30%
Corona vascular	Con cloroplastos ubicados en la pared celular (4-6 clop/cell)	Con grandes cloroplastos ubicados en la pared celular (5-6 clop/cell)	Con cloroplastos ubicados en la pared celular (3-4 clop/cell)	Con muy pocos cloroplastos ubicados en la pared celular (1-3 clop/cell)
Nº cell/corona vascular	4-13 células	5-8 células	10-16 células	11-15 células
Tamaño corona vascular	33-56 μ alto x 42-51 μ ancho	46-87 μ alto x 66-110 μ ancho	39-74 μ alto x 40-68 μ ancho	94-160 μ alto x 100-150 μ ancho
Cloroplastos	Granales en mesófilo y corona vascular	Granales en mesófilo, agranales en c. vascular.	Granales en mesófilo y corona vascular	Granales en mesófilo y corona vascular.

Figura 6: Secciones transversales de lamina foliar de *P. vulgaris* (C₃) **A** y **B** (10x y 40x) *Z. mays* (C₄) **C** y **D** (10x y 40x), *M. esculenta* (C₃-C₄) **E** y **F** (10x y 40x) y *C. subdentata*, **G** y **H** (10x y 40x), muestran: epidermis superior (**es**), parénquima en empalizada (**pe**), parénquima esponjoso (**pes**), espacios intercelulares (**eic**), corona vascular (**cv**), haz vascular (**hv**), epidermis inferior (**ei**), observadas por MOAR.



lagunar compuesto por varias capas de células. Según White y Montes (2005) un mayor espesor de la hoja es generalmente asociado con una mayor tasa de asimilación de carbono de la hoja, pero puede también estar relacionado con el contenido de agua de la especie. El equilibrio entre las hojas más gruesas en comparación con las más grandes también es afectado por la estructura del dosel y la intercepción de la luz.

❖ **Tejido mesofílico.** El tejido parenquimático de *C. subedentata*, (figura 6G y 6H) presenta los siguientes aspectos:

- Aunque se halla diferenciado en parénquima en empalizada (con células de forma no típica) y parénquima esponjoso, tiene una organización particular y específica que difiere del mesófilo de *P. vulgaris* y *M. esculenta* (figura 6A, 6B, 6E y 6F). Con *Z. mays*, no muestra similitud (figura 6C y 6D) ya que en esta especie el mesófilo no se halla diferenciado. En general se observa que las especies con mesófilo diferenciado en parénquima lagunar y parénquima en empalizada, presentan mayor número de cloroplastos en el tejido de empalizada que en el esponjoso, lo que representa uno de los aspectos característicos de este tipo de células por ser el parénquima clorofílico más especializado; así como su disposición junto a las paredes celulares principalmente durante la fotosíntesis activa de la planta cuando realizan movimientos de ciclosis (Esau, 1976)
- Aunque las coronas de sus haces vasculares están rodeados de una doble capa de células, en *C. subedentata* estas tienen un limitado número de cloroplastos (1-3 cloroplastos/célula) muy pequeños, similar a la vaina escasa en organelos de las plantas C_3 y diferente de la estructura en plantas C_4 , y también menor en número que el observado en especies intermedias.
- Los cloroplastos de la corona vascular ocupan menos del 5% del área celular, en contraste con más del 50% que ocupan estos organelos en las células de *Z. mays*, y que además son de mayor tamaño y contienen abundantes inclusiones de almidón, como se observa en la figura 7B; característica que tampoco se observa en *C. subedentata* dado que sus cloroplastos no presentan este tipo de moléculas.
- Respecto a *P. vulgaris* (4-6 cloroplastos/célula) y *M. esculenta* (3-4 cloroplastos / célula), también conserva una menor relación en cantidad y tamaño de cloroplastos y difiere en la presencia de granos de almidón que si poseen estas especies.

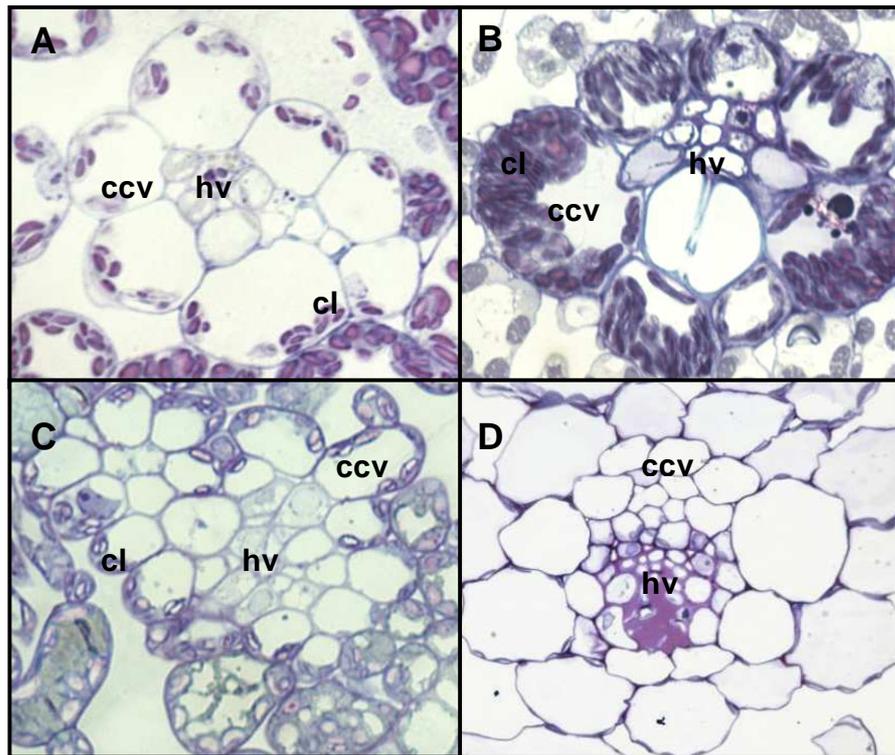
En este aspecto, las características de *C. subedentata* son similares a las de especies C_3 del género *Panicum* (género de plantas gramíneas con especies C_3 , C_4 y C_3 - C_4) en cuyas plantas se evidencia la presencia de haces vasculares con dos vainas, la vaina mestoma y la vaina parenquimática (Guevara y Ramia, 2007), pero que no corresponden a la típica anatomía Kranz.

❖ **Vaina del haz vascular.** La vaina o corona del haz vascular de una hoja, es una capa de parénquima compacto dispuesto alrededor de los vasos y un canal de comunicación entre los vasos y las células del mesófilo, que llevan a cabo el flujo de compuestos, durante el desarrollo foliar, durante la exportación de fotosintatos y durante la senescencia de la hoja. La vaina del haz también lleva a cabo el flujo de agua del xilema a las células del mesófilo y luego a los espacios intercelulares. Estas son las únicas células fuera del propio sistema vascular (xilema, floema, y algunas de sus células del parénquima asociado) a través de las cuales pueden pasar muchas sustancias (Leegood, 2007). Estas estructuras varían de acuerdo con la vía fotosintética que la planta utilice para la fijación de carbono, como se especifica en el ítem 2.3, principalmente por su número de células y presencia de cloroplastos.

En *C. subedentata* el número de células por corona vascular (11 - 15 células de diversos tamaños, observados en la figura 7D), es mayor en comparación con *Z. mays* (figura 7B) cuyas coronas están formadas por 5-8 células; en este carácter *C. subedentata* muestra mayor similitud con la anatomía de *P. vulgaris* (figura 7A) y *M. esculenta* (figura 7C), las cuales tienen de 7-13 y 10-16 células en la corona vascular respectivamente, lo que coloca estas tres especies dentro de un mismo rango. Igualmente es comparable con las especies C_3 del género *Panicum* que según Guevara y Ramia, 2007 presentan de 4 -12 células clorénquimáticas entre haces vasculares adyacentes, generando un consecuente amplio espaciado entre sus haces vasculares, así como ocurre en el tejido foliar de *C. subedentata*.

Los haces vasculares se presentan, en general ubicados en la parte central del mesófilo y en las especies con mesófilo diferenciado, por debajo del parénquima de empalizada; en *M. esculenta* se desplazan hacia la región abaxial, emergentes sobre la epidermis inferior. El tamaño se da en relación con el espesor de la lámina foliar mostrando una relación directamente proporcional con los valores promedio observados en el cuadro 3.

Figura 7. Secciones transversales de lámina foliar observadas por MOAR mostrando coronas vasculares de **A.** *P. vulgaris* (C₃) (100x) **B.** *Z. mays* (C₄) (100x), **C.** *M. esculenta* (C₃-C₄), (100x) y **D.** *C. subedentata* (40x), se observan células de la corona vascular (**ccv**), cloroplastos de corona vascular (**cl**) y haz vascular (**hv**)



❖ **Distancias intervenales.** La cercanía entre los haces vasculares es una característica particular de plantas con metabolismo C₄ (especialmente en gramíneas), en las que las distancias entre nervaduras son mas cortas que las de las especies C₃; en las primeras el número de células clorenquimáticas del mesófilo entre vainas adyacentes por lo general está entre 2 y 4, lo que favorece el transporte de metabolitos entre el mesófilo y las células de la vaina del haz dado que genera un contacto íntimo entre estas células (Leegood, 2007, Ueno *et al.* 2006, Ueno y Sentoku, 2006, Dengler *et al.* 1994 y Longstreth, *et al.* 1980). Para *C. subedentata* este valor oscila entre 6 y 12 células. Al hacer una comparación en términos de área, se evidencia una clara diferencia de *C. subedentata* con respecto de *Z. mays*, (monocotiledónea C₄); en hojas de *C. subedentata*, también monocotiledonea, se encuentran en promedio de 3-4 haces vasculares por cada cm² de tejido foliar, mientras que en *Z. mays* se hallan hasta 17 haces vasculares en un área equivalente, lo que muestra distancias intervenales mas grandes para

C. subdentata, que conserva una relación 1:6 con *Z. mays*. Estas distancias amplias en *C. subdentata* no aportarían una estructura óptima para el buen funcionamiento de la fotosíntesis C_4 , ya que en esta ruta de fijación de carbono, una distancia corta entre las células del mesófilo y las células de la vaina vascular es un requisito previo para el rápido transporte de los metabolitos fotosintéticos, así como la proximidad de las venas también puede ser necesaria para la expresión adecuada de las enzimas fotosintéticas en las células del mesófilo y las células de la vaina vascular (Ueno *et al.* 2006 y Langdale y Nelson, 1991).

Estas variaciones anatómicas están relacionadas con la presencia de tejido fotosintético por unidad de área, y las especies C_4 tienen la mayor cantidad de tejido fotosintético/área dentro de los tipos de vías metabólicas para la fijación de carbono; esto indica una alta divergencia entre *C. subdentata* y la especie C_4 estudiada, lo cual reduce la probabilidad de que *C. subdentata* sea una especie que fije carbono por esta vía metabólica. Una mayor similitud la presenta con *P. vulgaris*, especie C_3 en la que se hallan de 6-8 haces vasculares por cm^2 , por lo que *C. subdentata* conserva una relación 1:2 respecto de esta especie.

❖ **Espacios intercelulares.** Los tejidos de la lámina foliar en las especies estudiadas muestran claras variaciones en su estructuración, cada una presenta una apariencia particular cuando es observada al microscopio, tanto por la forma de sus células como por la distribución y organización de estas. Así, el tamaño y la forma de los espacios intercelulares que exponen son específicos para cada una de estas cuatro especies:

- En *P. vulgaris*, estos espacios alcanzan entre el 29 - 36 % de la lámina foliar, lo cual se da por los amplios espacios que contiene el parénquima en empalizada y las pequeñas y escasas células del parénquima lagunar, característica que no se observa en las otras especies.
- En *C. subdentata* los espacios intercelulares representan del 18 - 30 % según la región de la hoja, un valor parcialmente elevado para la cantidad y el tamaño de células observadas en el tejido, lo cual se debe al espesor de su lámina foliar, el cual es grande comparado con el de las otras especies, y el reducido desarrollo de su parénquima en empalizada que deja más espacio dentro del mesófilo para el tejido esponjoso, caracterizado por su amplio contenido de espacios aéreos.
- En *Z. mays* entre el 16- 24 % de su área foliar está desprovista de células, a pesar de no tener parénquima en empalizada; y...

- En *M. esculenta* se ven los porcentajes mas reducidos con el 8 – 14 %, valores que se ven disminuidos por el amplio desarrollo del parénquima en empalizada y la densa población de células del parénquima esponjoso.

De acuerdo con los anteriores datos y con respecto a los espacios intercelulares, *C. subedentata* está contenida entre el rango de valores de la especie C_3 y la especie C_4 , aunque cada una conserva su organización anatómica particular; mientras que, *M. esculenta* se halla por debajo de estos valores. *P. vulgaris* y *C. subedentata* tienen el mayor porcentaje de área foliar desprovista de células y mas espacio intercelular aéreo, característica propia de plantas C_3 .

4.3.1.2 Otras consideraciones. La anatomía que presenta *Z. mays* es como la descrita por Evans y von Caemmerer (1996) y Gunning (1996) para plantas C_4 , según los autores este tipo de fotosíntesis requiere una anatomía foliar especializada en la que las células fotosintéticas están organizadas en dos cilindros concéntricos: células mesofílicas de paredes delgadas adyacentes al espacio intercelular radiadas de las células de la vaina del haz de pared gruesa; así *Z. mays*, hoja típica C_4 o Kranz (figuras 6C, 6D y 7B); muestra tejido vascular rodeado por una capa de células formando la corona vascular (vaina mestoma), las cuales son muy cercanas entre si, estas células contienen numerosos cloroplastos con abundantes inclusiones de almidón localizados sobre la pared celular; y rodeando estas células se localizan las células del mesófilo (vaina parenquimática), con cloroplastos más pequeños y menos numerosos. Estas observaciones concuerdan con lo descrito por Riaño, *et al.* (1987)

Aunque, *M. esculenta*, (figura 6E y 6F) por ser una planta intermedia C_3 - C_4 , presenta mesófilo diferenciado, el parénquima de empalizada se halla ubicado en el lado adaxial de la hoja y tiene un acusado desarrollo; según Riaño *et al.* (1987) en yuca este tejido ocupa alrededor del 70 % del grosor de la hoja, formando a su vez una estructura de embudo; las células alargadas que lo componen contienen copiosos cloroplastos con gran cantidad de granos de almidón, como lo corroboran también Riaño *et al.* (1987) en un estudio sobre las características fotosintéticas de la yuca. El tejido vascular está rodeado por células ovaladas y de tamaño reducido con relación al tamaño de las células de las coronas de otras especies, estas células contienen cloroplastos en menor cantidad que *Z. mays* y se muestran localizados cerca de la pared celular como lo confirman Riaño *et al.* (1987). Una característica particular, no observada en las otras especies estudiadas, es que en *M. esculenta* se ven células similares a las de la vaina del haz que se extienden hacia la epidermis, lo que hace que se conozca como un tipo de hoja heterobárica. Estas extensiones de la vaina predominan en especies de hojas caducas, y generan compartimentos al interior de la hoja que previenen la difusión lateral de gases en el mesófilo, también, parecen ser adaptaciones al

ahorro de agua y la protección del mesófilo contra el estrés hídrico, así como también son capaces de disminuir la propagación de enfermedades y proporcionar apoyo estructural ya que estas hojas tienden a ser más delgadas y más fácilmente dañadas por el viento (Leegood, 2007 y Nikolopoulos, *et al.* 2002)

En frijol, planta C₃, igual que lo reporta Paz (1995) el parénquima en empalizada está formado por células alargadas y en disposición no compacta, contiene considerables espacios entre ellas, a diferencia del tejido en empalizada de plantas intermedias, sus células son más grandes y menos numerosas. Las coronas vasculares están compuestas por una capa sencilla de más o menos 7 células redondeadas, en las cuales es evidente la escasa presencia de cloroplastos localizados junto a la pared celular en los que se aprecian varios gránulos de almidón. El parénquima lagunar consta de pequeñas y pocas células con cloroplastos situados sobre las paredes celulares.

Las observaciones realizadas al microscopio y las características generales que poseen las plantas con diferentes vías metabólicas para fijación de carbono, sugieren que *C. subdentata* a pesar de tener una organización particular y no tener rasgos muy semejantes con las plantas escogidas para este estudio comparativo, sus caracteres anatómicos en conjunto se asemejan más a una planta con ruta metabólica C₃ que a las demás.

Se encuentra en primer lugar presencia de mesófilo diferenciado, con parénquima en empalizada constituido por células de forma no típica pero con número y tamaño de cloroplastos superior al presente en el tejido esponjoso y organizado en una o más capas, la notable reducción de la longitud de estas células es una característica propia de plantas que se desarrollan a la sombra, como es el caso de *C. subdentata*. Las células del parénquima lagunar se presentan dispuestas paralelamente a la superficie de la hoja formando varias capas y con amplios espacios entre ellas y no dispuestas alrededor de la corona vascular como en plantas C₄. El área celular ocupada por cloroplastos, como ya se ha mencionado, es bastante baja (> 5%) dado que esta planta posee una vaina vascular poco definida y con escasos organelos como en las plantas C₃, lo que difiere mucho de la vaina de plantas C₄ en las cuales este valor se halla por encima del 50%, a razón de la elevada tasa fotosintética que las caracteriza.

Las distancias intervenales que tiene *C. subdentata* son acordes con la anatomía que tienen las plantas C₃, en las que el número de células entre cada haz vascular es mayor que el presente en plantas con vía metabólica de fijación de carbono C₄ y C₃-C₄ y por lo tanto la distancia entre un haz y otro, y como lo muestran los

resultados *C. subedentata* conserva una proporción 1:2 con relación a la especie C_3 estudiada, esta característica muestra que la cantidad de tejido mesofílico por unidad de área para *C. subedentata* es menor que el que debería tener si esta fuera una especie C_4 .

4.3.2 Relaciones ultraestructurales. Las observaciones de la ultraestructura de cloroplastos permitieron establecer la organización que tienen los cloroplastos de las diferentes especies utilizadas en el presente estudio.

Las micrografías electrónicas de *Z. mays* muestran un marcado dimorfismo entre los cloroplastos del mesófilo y los de la corona vascular, característica propia de las plantas con ruta metabólica C_4 , como lo reportan Gunning (1996) y Lawton (1988) para esta especie. En las células mesofílicas, se observan cloroplastos con apilamiento de membranas tilacoidales, figura 8A y 8B; los cuales constituyen grana claramente definidos y contienen pocos granos de almidón; igual que lo describe Riaño *et al.* (1987). Cada asociación contiene entre 7 y 21 membranas tilacoidales conectadas por lamelas estromales en proporción de una lamela por cada dos o tres tilacoides. Según lo reporta Paz (1995) en *Z. mays* se pueden hallar agrupaciones granales de hasta sesenta membranas tilacoidales. Los cloroplastos de la corona vascular, figura 8C; por el contrario están compuestos de largos tilacoides que se extienden por entre grandes y abundantes granos de almidón, datos corroborados por Riaño *et al.* (1987).

La ultraestructura de cloroplastos en *P. vulgaris*, (figura 9A, 9B, 9C y 9D) muestra tilacoides asociados en grana tanto en los cloroplastos del mesófilo como en los de corona vascular, típicos de las plantas C_3 , y sin grandes diferencias estructurales, Paz (1995) describe cloroplastos sin diferencias estructurales en *P. vulgaris* y añade que se observan abundantes asociaciones cloroplasto-mitocondria. Los grana están constituidos por la unión de entre 9 -12 membranas tilacoidales, unidas por 4 - 5 lamelas bien definidas; según Stoyanova y Velikova (1997) los grana son de diferente tamaño y varían desde 4, 15 o 18 tilacoides los cuales están conectados por un pequeño tilacoide estromal y reporta también, la presencia de plastoglóbulos en algunos cloroplastos de esta especie, dato que difiere con lo encontrado en esta investigación. Inmersos en el cloroplasto, se aprecian también grandes granos de almidón largos y delgados. Thompson (1965), refiere que en *P. vulgaris* las regiones internas de los granas están separadas del estroma y que el sistema de tilacoides libres parece ser un sistema de membranas continuas, esta característica es poco apreciable en las micrografías obtenidas en este trabajo, pero si se evidencian claramente largas fibras tilacoidales que se extienden entre los granos de almidón.

Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de *Zea mays* mostrando, **A.** cloroplasto granal (**cl**) de mesófilo (25000x) en el que se observan grana (**g**), lamelas estromales (**le**), **B.** ampliación fotográfica de cloroplasto de mesófilo (a partir de micrografía de 25000x) y **C.** tilacoides (**t**) en cloroplasto agranal de corona vascular y varios granos de almidón (**ga**), (30000x).

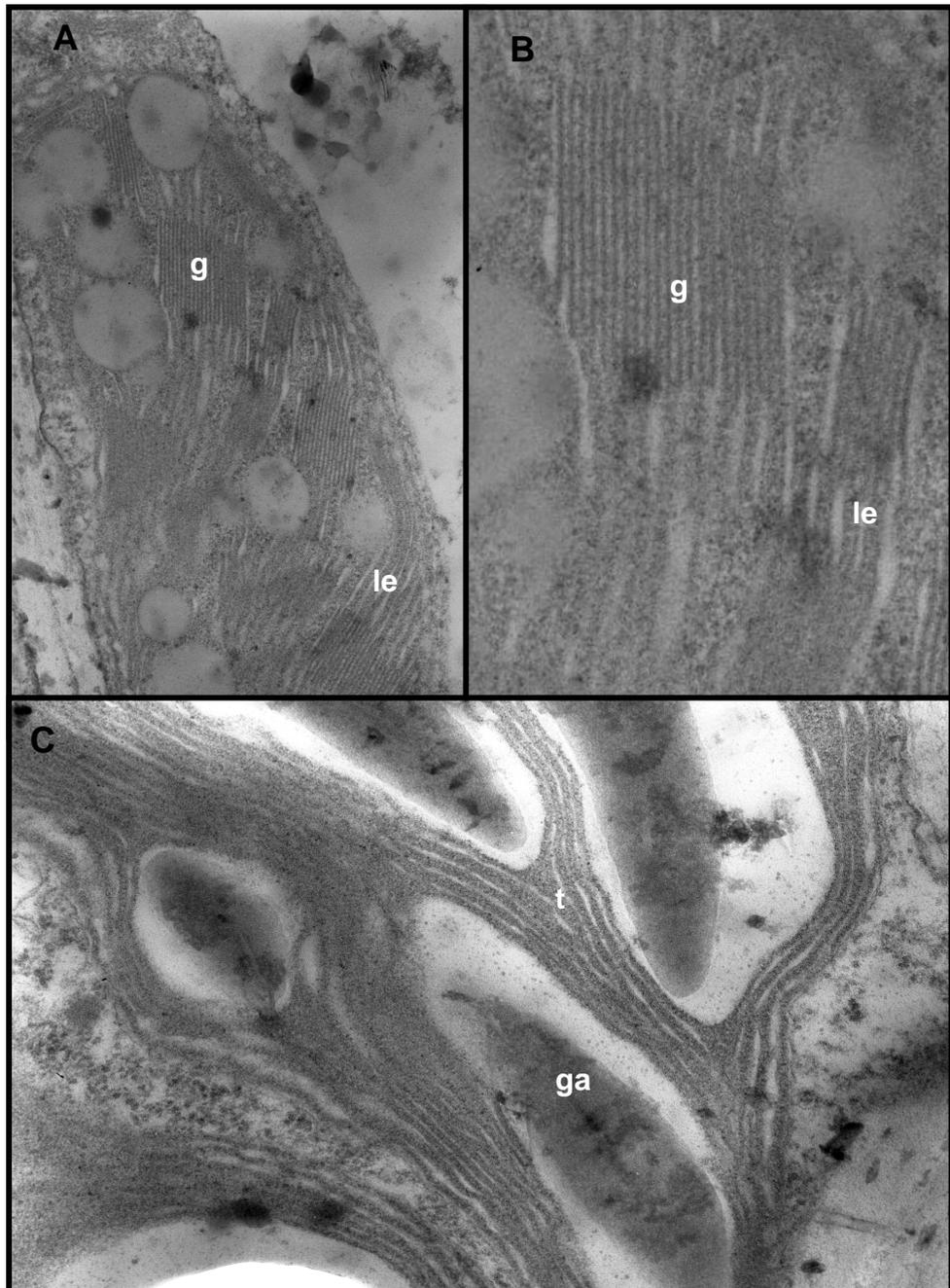
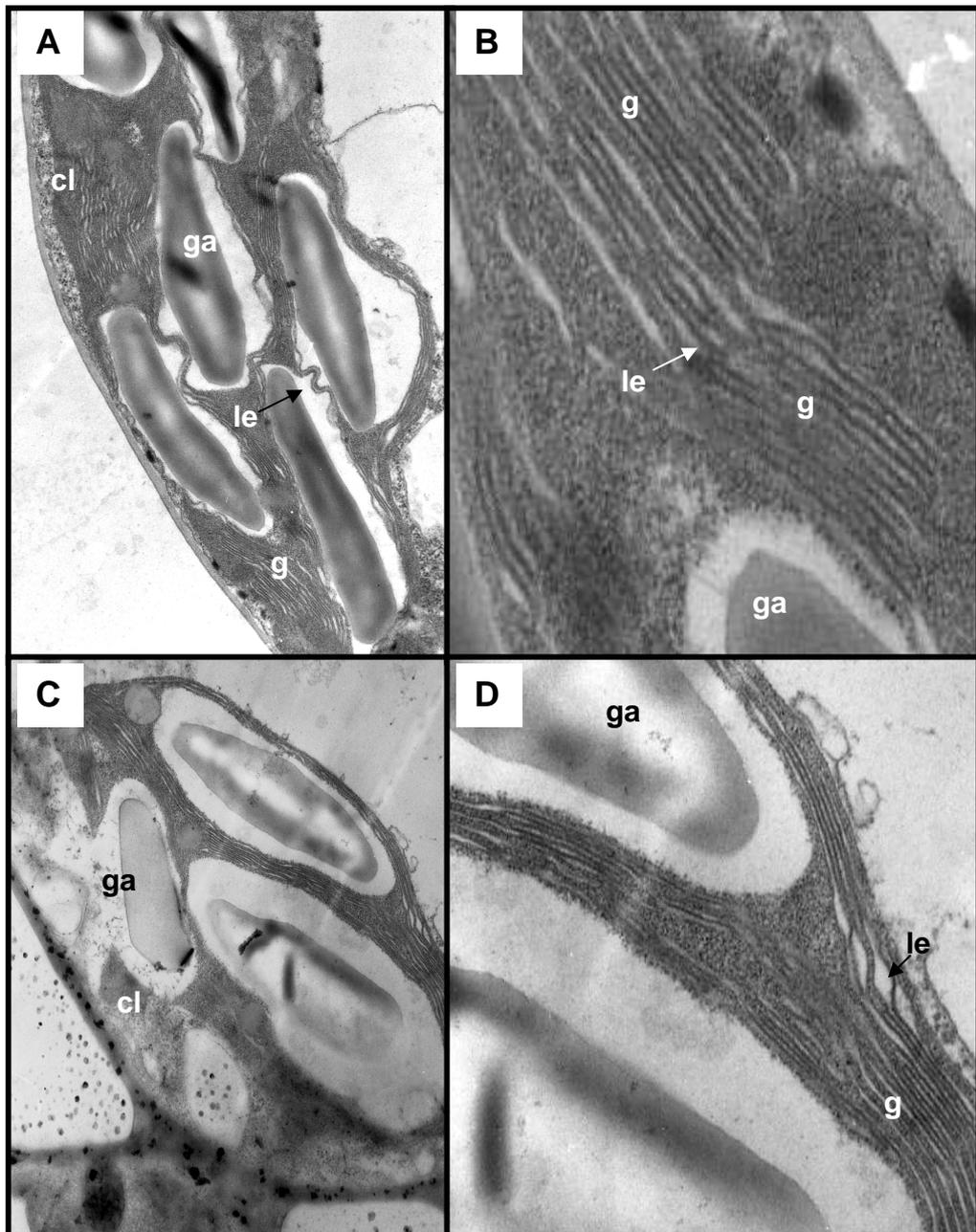


Figura 9. Micrografías electrónicas de transmisión de *P. vulgaris* mostrando **A.** cloroplasto granal (**cl**) de mesófilo (12000x) **B.** ampliación fotográfica de cloroplasto del mesófilo (a partir de micrografía de 12000x), **C.** cloroplasto granal de corona vascular (12000x) y **D.** ampliación fotográfica de cloroplasto de la corona vascular (a partir de micrografía de 12000x), se observan grana (**g**), lamelas estromales (**le**) y granos de almidón (**ga**).



M. esculenta, como se describe en un estudio ultraestructural realizado por Paz (1995) sobre la yuca, presenta cloroplastos mesofílicos (figura 10A y 10B) constituidos por tilacoides claramente definidos y muy bien organizados en el estroma cuyo espacio comparten con grandes y abundantes granos de almidón. Cada grana está conformado por 8-18 tilacoides cortos y simétricos, cada 2-3 tilacoides se observa una lamela interconectando los grana. Las células de la corona vascular tienen cloroplastos igualmente granales (figura 10C y 10D), pero en estos los grana no se aprecian tan organizados, igual que lo reporta Riaño *et al.* (1987) quienes los describen como “difusos y dispersos por toda la matriz del cloroplasto sin formar estructuras características”. Sus grana contienen hasta 15 tilacoides de estructura diferente y están unidos por lamelas más largas. En estos cloroplastos se observan granos de almidón y son más largos y delgados que los encontrados en los cloroplastos del mesófilo.; la observación de estas moléculas difiere de lo descrito por Riaño *et al.* (1987) quienes reportan cloroplastos sin inclusiones de almidón.

La organización tilacoidal de *C. subedentata* indica una sola clase de cloroplastos en su tejido foliar (figura 11A, 11B y 11C). A nivel de mesófilo, y como se describió anteriormente, se hallan cloroplastos con grana formados por 11-29 tilacoides de longitud asimétrica y muy finos, conectados por varias lamelas cortas. Y en las células de la corona vascular, se observan cloroplastos con grana (figura 11D y 11E), pero aquí estas estructuras son menores en número y las membranas tilacoidales que los conforman son más largas.

La ultraestructura de cloroplastos de *C. subedentata*, muestra formaciones granales largas, conformadas por bastantes tilacoides e interconectadas por lamelas estromales más cortas, en comparación con los grana de las otras especies estudiadas; estas por su parte, tienen grana cortos y muy bien definidos, principalmente a nivel de mesófilo, región en la que todas las especies estudiadas presentan estas agrupaciones, lo que es observable en la figura 12A, 12C, 12E y 12G; y en la corona vascular aquellas especies que poseen estas asociaciones,

Figura 10 Micrografías electrónicas de transmisión de *Manihot esculenta* **A.** cloroplasto granal (**cl**) de mesófilo (12000x), **B.** ampliación fotográfica de cloroplasto de mesófilo (a partir de micrografía de 12000x) **C.** cloroplasto granal de corona vascular (25000x), **D.** ampliación fotográfica de cloroplasto de corona vascular (a partir de micrografía de 25000x), se observan asociaciones granales (**g**), lamelas estromales (**le**), granos de almidón (**ga**).

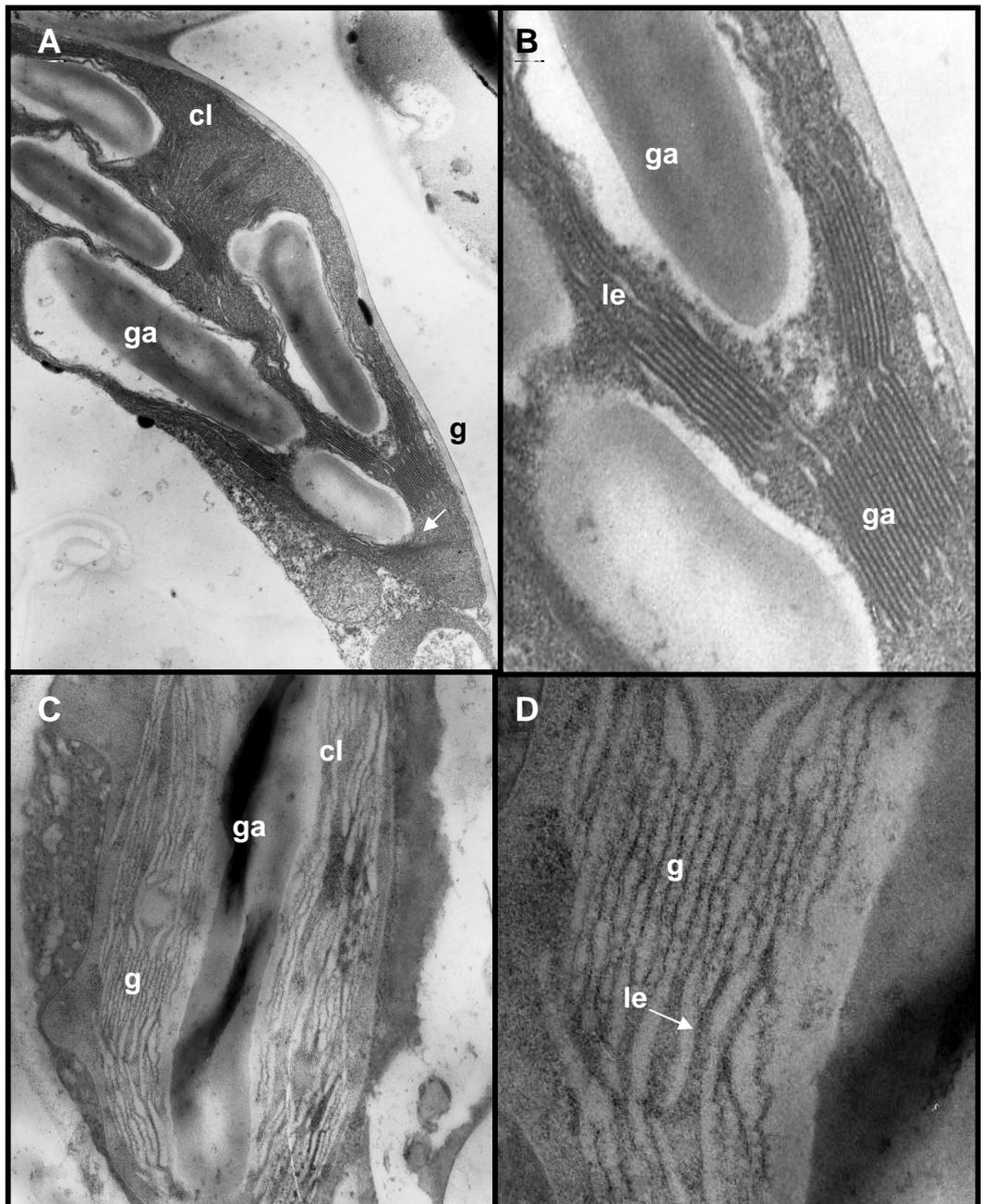


Figura 11. Micrografías electrónicas de transmisión de *Caliphuria subdentata*, **A.** cloroplasto granal (**cl**) de mesófilo (5000x), **B** y **C.** ampliación fotográfica de cloroplasto de mesófilo (a partir de micrografía de 5000x) en la que se observan los grana, **D.** cloroplasto granal de corona vascular (20000x), **E.** ampliación fotográfica de cloroplasto de corona vascular (a partir de micrografía de 20000x), e observan grana (**g**), lamelas estromales (**le**), pared celular (**pc**) y lámina media (**lm**).

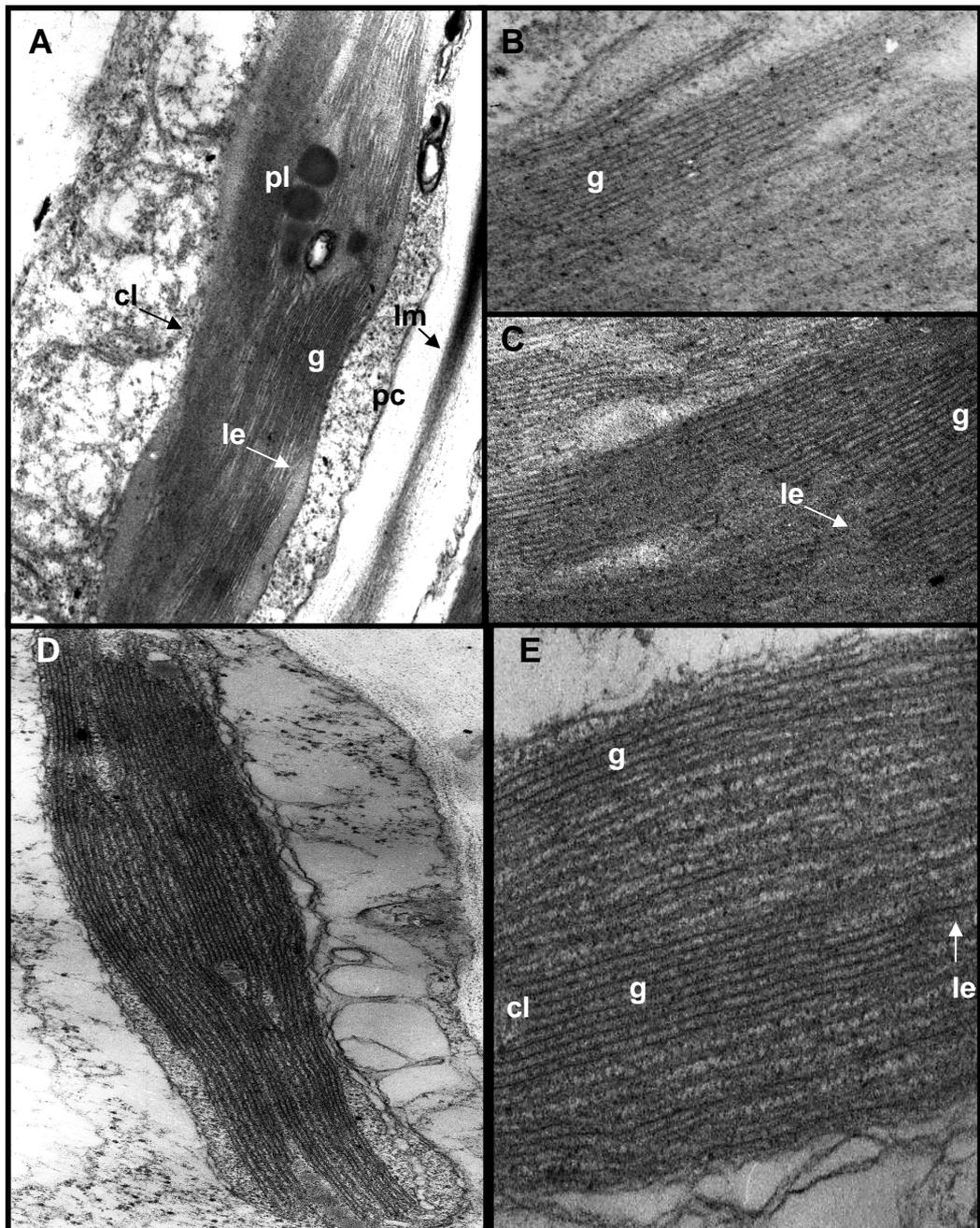
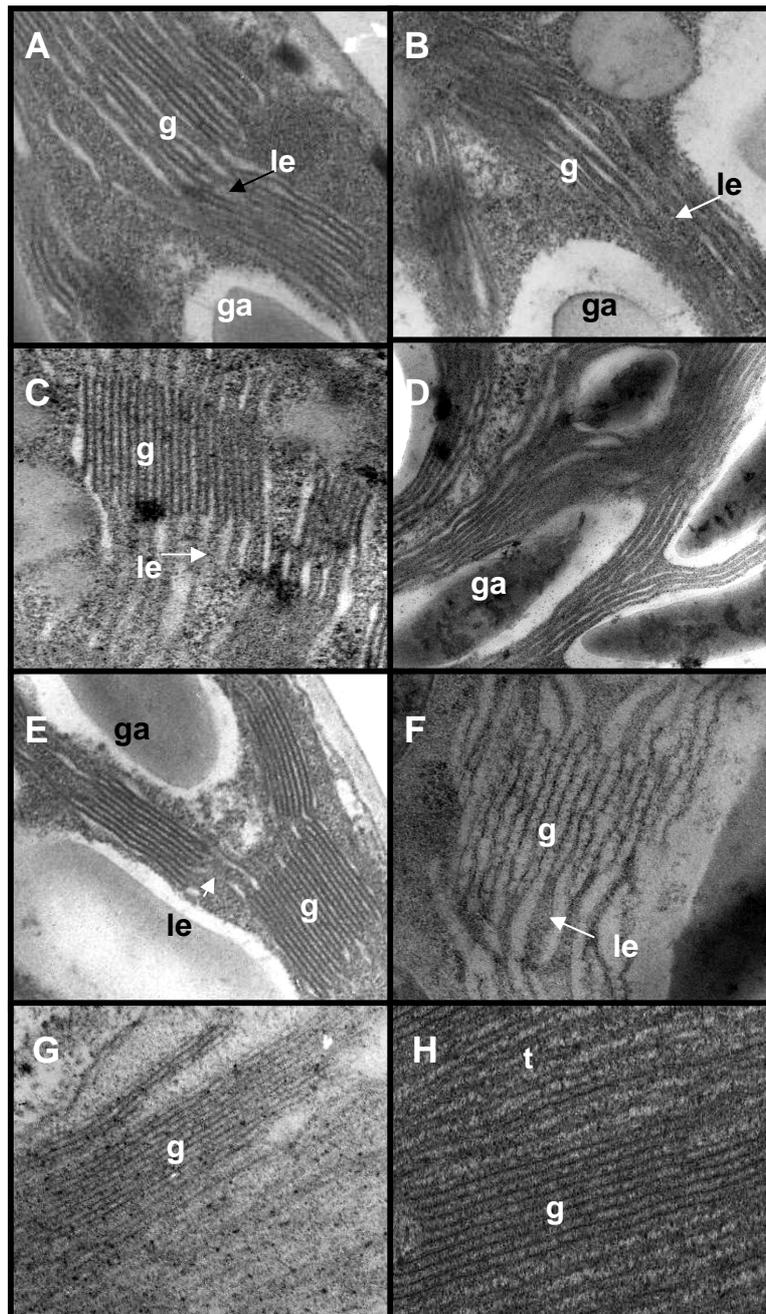


Figura 12. Comparación de la organización tilacoidal de cloroplastos de *P. vulgaris* **A.** grana mesofílico y **B.** grana de corona vascular, de *Z. mays*, **C.** grana de cloroplasto de mesófilo y **D.** tilacoides (**t**) de cloroplasto de corona vascular, de *M. esculenta*, **E.** grana mesofílico y **F.** grana de corona vascular, y de *C. subdentata*, **G.** grana mesofílico y **H.** grana de corona vascular. Se observan lamelas estromales (**le**), granos de almidón (**ga**) y grana (**g**). Las ampliaciones fotográficas se obtuvieron a partir de micrografías de: **A** y **F.** 25000x, **B.**30000x, **C,D** y **E.** 12000x, **G.** 5000x y **H.** 20000x.



que son: *P. vulgaris* figura 9C y 9D, *M. esculenta* figura 10C y 10D, y *C. subedentata* figura 11D y 11E).

De esta forma el volumen estromal donde están localizadas las enzimas del ciclo de Calvin es reducido, pero los grana que ocupan un mayor porcentaje del estroma del cloroplasto contienen la mayor parte de la clorofila (Lambers, *et al.* 2008), característica que es propia de los cloroplastos de aquellas hojas que se desarrollan a la sombra, como es el caso de *C. subedentata*. El hecho que las otras especies estudiadas sean plantas que crecen bien a niveles más altos de irradiancia, por ser plantas de sol, hace que las diferencias en la forma de los grana de sus cloroplastos con relación a *C. subedentata* sean bien notorias. Estas diferencias se dan incluso, entre los lados de una misma hoja, encontrando, como se observa en la figura 4B, que los cloroplastos de mesófilo localizados en el lado abaxial de la hoja de *C. subedentata* contienen más número de grana y espacio estromal reducido, y los cloroplastos en la zona de empalizada (haz de la hoja), mantienen un menor número de grana respecto del envés de la hoja, pero mayor que el de las hojas de las otras especies.

En las coronas vasculares, la única especie que presenta cloroplastos sin formaciones granales es *Z. mays*, un estudio realizado por Solis *et al.* 1989 reveló la formación de cloroplastos con grana poco desarrollados en este tipo de células en callos de *Z. mays*. En estos cloroplastos los tilacoides son largas fibras como las observadas en la figura 8B; las otras especies en cambio poseen cloroplastos granales tanto en el mesófilo como en las células de la corona, lo que hace que *C. subedentata* sea divergente de *Z. mays*, dada la presencia de cloroplastos granales tanto en el mesófilo como en las células de su corona vascular. Por otro lado, esta planta muestra similitud con la especie C_3 y C_3 - C_4 estudiadas, las cuales tampoco presentan cloroplastos dimórficos, aunque cada una de las especies tiene una organización granal particular.

La formación de grana en los cloroplastos es una característica que permite hacer una separación espacial de los fotosistemas dentro del estroma y se considera como una estrategia adaptativa frente a la naturaleza para separar los sistemas en rápidos y lentos de acuerdo con su cinética de captura excitónica (Wilhem H. y Wilhem C, 1993); así estos sistemas están asociados con diferentes regiones de las membranas tilacoidales, el fotosistema II se localiza en las formaciones granales donde se halla densamente empaquetado en una membrana, con este arreglo estructural, el fotosistema II, que es aproximadamente tres veces más lento que el fotosistema I, puede estar presente en mayor cantidad. (Paz, 1995). El fotosistema I por su parte, se halla en las membranas tilacoidales no apesadas del cloroplasto, donde están localizadas las enzimas del ciclo de Calvin (Lambers, *et al.* 2008). La estructuración granal de *C. subedentata* podría indicar una alta

concentración de PSII en los cloroplastos de mesófilo los cuales contienen amplios grana de abundantes membranas tilacoidales mientras que los tilacoides estromales son menos abundantes.

En las plantas C_4 , las células del mesófilo no realizan ciclo de Calvin, dado que las enzimas de este ciclo están localizadas en los cloroplastos de la corona vascular, así, el contenido de almidón está restringido a los cloroplastos de la corona vascular y los del mesófilo solo lo almacenan cuando los cloroplastos de la corona alcanzan sus máximas concentraciones (Lambers, *et al.* 2008). Por el contrario, en *C. subedentata*, la presencia de esta molécula es inapreciable tanto en los cloroplastos del mesófilo como en los de la corona vascular, posiblemente por el consumo de carbono que le implica la síntesis de compuestos por metabolismo secundario, tales como los compuestos alcaloídicos tipo galantamina que sintetiza esta especie (Cabezas, 2002), y en este contexto la planta quizá no disponga de un excedente de carbono para síntesis de carbohidratos de reserva como el almidón. Otra explicación tentativa para la ausencia de almidón en los cloroplastos de *C. subedentata* es que esta planta al habitar en condiciones naturales en un ambiente con baja disponibilidad de luz sintetice almidón en cantidades muy bajas, característica propia de plantas esciófilas (Azcon-Bieto *et al.* 2003 y Barceló *et al.* 1998).

4.3.3 Consideraciones finales. Como una característica anatómica adicional que puede relacionarse con la capacidad fotosintética y por ende con el tipo de vía de fijación de carbono, se puede mencionar que en general las hojas con mayor capacidad fotosintética tienen estomas adicionales en su epidermis superior, como estructura que favorece el proceso de difusión ya que así se reduce la longitud del trayecto de difusión (Evans y von Cammerer, 1996); y como está documentado los valores más elevados de fotosíntesis los tiene la vía fotosintética C_4 (Ueno *et al.* 2006). Como se vio en el análisis anatómico de las especies estudiadas, la única que presenta esta característica es *Z. mays*, especie representativa del metabolismo C_4 , cuyas hojas presentan estomas tanto en el haz como en el envés, por lo que sus hojas son anfiestomáticas; mientras que *P. vulgaris* (C_3), *M. esculenta* (C_3 - C_4), así como *C. subedentata* tienen hojas hipostomáticas. Además, las distintas vías metabólicas para la fijación de carbono tienen sus ventajas en diferentes ambientes; es interesante vincular entonces la distribución de especies C_3 y C_4 con condiciones ambientales como temperatura, humedad, precipitación y altitud. Por lo general, las especies C_3 son frecuentes en lugares húmedos, sombríos y en altas montañas; similares a los hábitats en los que crece *C. subedentata*, mientras que las especies C_4 habitan en ambientes secos, con gran exposición solar (lo cual es altamente dañino para *Caliphuria*) y en terrenos llanos. De este modo, y teniendo en cuenta las demás características anatómicas analizadas *C. subedentata* podría pertenecer al grupo de las especies C_3 .

5. CONCLUSIONES

El estudio de la organización estructural de la lámina foliar de *C. subdentata* permitió describir su anatomía, la cual se detalla específicamente en el presente trabajo. Así como, la composición tilacoidal de sus cloroplastos mediante el estudio de la ultraestructura que mostró cloroplastos granales tanto en el mesófilo como en las células de la corona vascular.

El estudio estructural de la lamina foliar de *C. subdentata* reveló que esta planta posee mesófilo diferenciado en parénquima lagunar y parénquima en empalizada, haces vasculares rodeados por vaina mestoma (sin cloroplastos) y vaina parenquimática (pobre en organelos), así como un alto porcentaje de espacios intercelulares, grandes distancias intervenales y hojas hipostomáticas.

De igual manera, el estudio en las otras especies indicó que *Z. mays*, como planta típica C_4 , presenta anatomía Kranz, distancias intervenales cortas y hojas anfiestomáticas. *M. esculenta* tiene mesófilo diferenciado con parénquima en empalizada bien desarrollado, coronas vasculares con extensiones y contenido moderado de cloroplastos, pocos espacios intercelulares y hojas hipostomáticas. Y *P. vulgaris* posee mesófilo diferenciado, haces vasculares rodeados por una vaina con pocos cloroplastos, distancias intervenales grandes y hojas hipostomáticas.

Caliphuria subdentata tiene características anatómicas que difieren de la organización de las especies patrón, pues no presenta mesófilo con marcada similitud a plantas como *Z. mays*, *M. esculenta* o *P. vulgaris*. *C. subdentata* posee caracteres anatómicos como vaina del haz vascular poco desarrollada y pobre en organelos, mesófilo con parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, y ausencia de cloroplastos dimórficos que eliminan la posibilidad de que haya asimilación de CO_2 por la vía C_4 ; así mismo, diverge de la vía fotosintética intermedia C_3 - C_4 ya que en este tipo de plantas las células de la corona vascular contienen un número considerable de cloroplastos y las distancias intervenales son mas cortas que las que presenta *C. subdentata*

Tanto el estudio estructural del tejido foliar, como el análisis ultraestructural de los cloroplastos en *C. subdentata*, soportan fuertemente la hipótesis que esta planta podría realizar la fijación de carbono en la fotosíntesis por la ruta metabólica C_3 .

6. RECOMENDACIONES

Debido a que estudios anatómicos del tejido foliar y ultraestructurales de los cloroplastos, sólo permiten hacer una aproximación a la ruta metabólica para fijación de carbono seguida por *C. subdentata*, se recomienda hacer un estudio fisiológico que permita estimar la asimilación de CO₂, el punto de compensación de CO₂, el punto de compensación de luz y la fotorrespiración, así como también un estudio bioquímico orientado al análisis de enzimas que participen en la fotosíntesis, a fin de poder establecer con exactitud la ruta metabólica seguida por esta planta para la fijación de carbono en su proceso fotosintético.

BIBLIOGRAFÍA

ASCENCIO, Jocelyne. Mecanismos fotosintéticos en plantas con fotosíntesis intermedia C_3 - C_4 y en plantas acuáticas. Revista facultad de. agronomía (Maracay). [En línea]. Dic. 1982. Vol. XII, no. 3-4 [Citado 10 Febrero 2009], p 267-282. Disponible en internet en: http://www.redpav.avepagro.org.ve/fagro/v12_34/v124m006.htmlm

AZCON - BIETO Joaquín y TALON, Manuel. Fundamentos de fisiología vegetal. McGRAW-HILL. Interamericana. Madrid, España, 2003. p 522.

BARCELO COLL, Juan, NICOLÁS RODRIGO, Gregorio, SABETER GARCIA, Bartolomé y SÁNCHEZ, Ricardo. Fisiología vegetal. EDICIONES PIRÁMIDE. Madrid, España. 1998. p 662

BECERRA DE LOZANO, Nubia, BARRERA, Eduardo y MARQUÍNEZ, Xavier. Anatomía y morfología de los órganos vegetativos de las plantas vasculares. Bogotá, 2002. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

BROWN, R. Harold, BOUTON JH, EVANS PT, MALTER HE y RIGSBY LL. Photosynthesis, morphology, leaf anatomy, and cytogenetics of hybrids between C_3 and C_3/C_4 *Panicum* species. Plant physiology [En línea], Mar., 1985. Vol. 77, no. 3 [Citado 16 Septiembre 2009], p. 653-658. Disponible en internet en: <http://www.jstor.org/stable/4269199>

BROWN, Harold y HATTERSLEY, Paul. Leaf anatomy of C_3 - C_4 species as related to evolution of C_4 photosynthesis. Plant physiology, [En línea]. Dic. 1989. Vol. 91, no. 4 [Citado 02 Agosto 2009], p. 1543-1550. Disponible en internet en: <http://www.jstor.org/stable/4272551>

BYOTT, G. S. Leaf air space systems in C_3 and C_4 species. New Phytologist, [En línea]. Mar., 1976. Vol. 76, no. 2 [Citado 31 Marzo 2010], p. 295-299. Disponible en internet en: <http://www.jstor.org/stable/2434595>

CABEZAS, Fabio A. Estudio fitoquímico de alcaloides de *Crinum cunthianum* Roem y *Eucharis amazónica* Planchon & Linden (Amaryllidaceae). 2002. Tesis doctoral [Ciencias químicas]. Universidad del Valle.

_____, Fabio, ARGOTI, Juan, MARTÍNEZ, Santiago, CODINA, Carles, BASTIDA, Jaume y VILADOMAT, Francesc. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*, *Caliphuria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. Scientia et technica. May., 2007. Vol. XIII, no 33.

CALDERÓN, Eduardo. Listas rojas preliminares de plantas vasculares de Colombia, incluyendo orquídeas. Instituto de investigaciones biológicas Alexander von Humboldt. [En línea]. 2003 [Citado 31 Marzo de 2009]. Disponible en internet en: http://www.humboldt.org.co/conservacion/plantas_amenazadas.htm

CORTÉS BENAVIDES, Felipe. Cuadernos de histología vegetal. EDITORIAL MARBAN S. A. Tercera edición. Madrid, España, 1990.

DALTON HOOKER, Sir Joseph, M.D., C.B., K.C.S.I., P.R.S., F.L.S., etc. Comprising the plants of the royal gardens of Kew and of other botanical establishments in Britain, with suitable descriptions. Curtis's Botanical Magazine. [En línea]. London, Britain. 1877. Vol. XXXIII of the third series [Citado 25 Julio 2010]. Disponible en internet en: www.botanicus.org/page/464871,464872,464873

DENGLER Nancy G, DENGLER Ronald E, DONELLY Petra M, HATTERSLEY Paul W. Quantitative leaf anatomy of C₃ and C₄ grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationships. Annals of botany. [En línea]. 1994. Vol 73, no 3 [Citado 31 Julio 2010], p. 241-255. Disponible en Internet en: <http://aob.oxfordjournals.org>

ESAU, Katherine. Anatomía vegetal. Ediciones OMEGA, S. A. Tercera edición. Barcelona, España, 1976.

EVANS, John R. y von CAEMMERER, Susanne. Carbon dioxide diffusion inside leaves. Plant physiology. [En línea]. 1996. Vol 110 [Citado 13 Agosto 2010], p. 339 – 346. Disponible en internet en: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/110/2/339.pdf>

EVERT, Ray Franklin. Esau's plant anatomy. Wiley Interscience. Third Edition. Hoboken, New Jersey, United States of America .2006. p 567.

FURBANK, Robert T. & FOYER, Christine H. C₄ plants as valuable model experimental systems for the study of photosynthesis. New phytologist, [En línea]. Jul. 1988. Vol. 109, no. 3 [Citado 14 Marzo 2010]. p. 265-277. Disponible en internet en: <http://www.istor.org/stable/2434666>.

GUEVARA O, Lorena I y RAMIA, Mauricio. Anatomía foliar de *Panicum* L., sección Parvifolia (Poaceae, Paniceae) en Venezuela. Rodriguésia [En línea]. 2007. Vol 58, no. 1 [Citado 19 Agosto 2010], p 073-083. Disponible en internet en: http://rodriguesia.jbrj.gov.br/rodrig58_1/008-061-05.pdf

GUNNING, Brian E. S. Plant Cell Biology. Editorial, Sales, and Customer Service Offices. London. 1996. p 211

LAMBERS, Hans; CHAPIN III & PONS, Thijs L. Plant physiological ecology. 2 ed. Springer. 2008. p 623.

LANGDALE, Jane A. y NELSON, Timothy. Spatial regulation of photosynthetic development in C₄ plants. Trends in genetics. [En línea] Jun. 1991. Vol. 7, no 6, [Citado 12 Septiembre 2010], p 191-196. Disponible en internet en: <http://www.sciencedirect.com/science>

LAWTON, June R. Ultrastructure of chloroplast membranes in leaves of maize and ryegrass as revealed by selective staining methods. New phytologist. [En línea] Mar., 1988. Vol. 108, no. 3 [Citado 25 Septiembre 2010], p. 277-283. Disponible en internet en: <http://www.istor.org/pss/2433294>

LEEGOOD, Richard C. Roles of the bundle sheath cells in leaves of C₃ plants. Journal of Experimental botany [En línea]. Dic. 2007. Vol. 59, no. 7 [Citado 03 Septiembre 2010], p. 1663 – 1673. Disponible en internet en: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/59/7/1663.full.pdf>

LEEGOOD, Richard C. C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. Journal of experimental botany. [En

línea]. Abr. 2002. Vol. 53, no. 369. [Citado 10 Septiembre 2010], p. 581 – 590. Disponible en internet en: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/53/369/581.full.pdf>

LONGSTRETH, David J., HARTSOCK, Terry L. y NOBEL Park S. Mesophyll cell properties for some C₃ and C₄ species with high photosynthetic rates. *Plants physiology plantatum*. [En línea]. Abril 1980. Vol. 48, no. 4 [Citado 01 Septiembre 2010], p. 494 – 498. Disponible en internet en: <http://onlinelibrary.wiley.com>

MEDINA, Clara Inés, SÁNCHEZ, Darío, TAMAYO, Gloria, LOBO, Mario y MARTÍNEZ, Enrique. Anatomía foliar comparativa de materiales de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) con y sin espinas. *Revista Corpoica – Ciencia y tecnología agropecuaria*. [En línea] 2008. Vol. 9, no.1 [Citado 13 Enero 2009], p. 5 - 13. Disponible en internet en: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/RevV09Afinalbaja.pdf>

MEEROW, Alan W. Systematic of the amazon lilies, *Eucharis* y *Caliphruria* (Amaryllidaceae) En: *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 136-220. 1989.

MERCER., E.H. Y BIRBERK, S. C. *Manual de Microscopía Electrónica para biólogos*, Ediciones Blume, Madrid. 85p. 1974

MONSON, Russell K., EDWARDS, Gerald E. y KU, Maurice S. B. C₃- C₄ intermediate photosynthesis in plants. *American institute of biological sciences*. [En línea] Oct., 1984. Vol. 34, no. 9 [Citado 13 Febrero 2009], p. 563 - 574. Disponible en internet en: <http://www.jstor.org/stable/1309599>

NELSON, Timothy y LANGDALE, Jane. A. Patterns of leaf development in C₄ plants. *The plant cell*. [En línea] Jun. 1989. Vol. 1 [Citado 23 Agosto 2010], p. 3 – 13. Disponible en internet en: <http://www.plantcell.org/cgi/reprint/1/1/3.pdf>

NIKOLOPOULOS Dimosthenis, LIAKOPOULOS Georgios, DROSSOPOULOS Ioannis y KARABOURNIOTIS George. The relationship between anatomy and photosynthetic performance of heterobaric leaves. *Plant physiology*. [En línea] May. 2002. Vol. 129, no. 1 [Citado 14 Agosto 2010], p. 235 - 43. Disponible en internet en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC155887/?tool=pubmed>

OPIK, Helgi y ROLFE, Stephen A. The physiology of flowering plants. Fourth Edition. Cambridge University Press, New Cork. United States of America .2005. p. 376.

PAZ, Liliana. Ultraestructura foliar y fotosíntesis de yuca en diferentes cultivares *Manihot esculenta* (Crantz). . Popayán. 1995. Trabajo de grado [Licenciatura en Biología]. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

PRASADA RAO, A. y RAJANDRUDU, G. Net photosynthetic rate in relation to leaf anatomical characteristics of C₃, C₃-C₄ and C₄ dicotyledons. Biomedical and life sciences, [En línea]. Oct., 2007. Vol. 99, no 6. [Citado 17 Enero 2009], p. 529-537. Disponible en internet en: <http://www.springerlink.com/content/f87h686656205004/>

PRZYBYL, Krystyna e IDZIKOWSKA, Kristyna. Ultrastructural changes in chloroplasts of mesophyll cells of chlorotic and prematurely yellowed leaves of *Betula pendula* (Rothr.). Acta societatis botanicae. [En línea]. Oct. 2003. Vol. 72, no. 4 [Citado 28 Septiembre 2010], p. 289 – 293. Disponible en internet en: http://www.botany.pl/pubs-pdfpdf/Acta%20Societatis%20Botanicorum/2003/4_289293.pdf

RIAÑO, Nestor M.; COCK, James .H.; LOPEZ F., Yamel.; EL-SHARKAWY, M. Anatomía Kranz, estructura y distribución de cloroplastos en hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista comalfi. [En línea] 1987. Vol.14, no. 1-4. [Citado 08 Octubre 2010], p. 5-12. Disponible en internet en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe>

RIAÑO, Nestor M., COCK, James H. y LÓPEZ F., Yamel. Características fotosintéticas de la yuca *Manihot Esculenta* Crantz. Anatomía foliar, ultraestructura de cloroplastos, tasas fotosintéticas y productos iniciales de la fijación del CO₂ con ¹⁴C. Acta agronómica. [En línea]. 1987. Vol. 37, no. 3. [Citado 10 Octubre 2010], p. 7 - 17. Disponible en internet en: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/viewFile/15309/16104

RUDALL, Paula J. Anatomy of flowering plants. An introduction to structure and development. Cambridge University Press. Third edition. New York, United States of America. 2007. p. 109

SOLARI, Mónica, RODRÍGUEZ DELFÍN, Alfredo, JACOBSEN, Sven E., SOPLÍN, Hugo, GUERRERO, Juan y HELFGOTT, Salomón. Efecto de aplicaciones foliares de metanol sobre el rendimiento de Lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ecología aplicada [En línea]. Dic. 2004. Vol. 3 (1, 2), [citado 12 Julio 2009], p. 29 - 34. Disponible en internet en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/341/34130205.pdf>

SOLÍS, C., SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, E., LOYOLA-VARGAS, V. M., CÁRABEZ, A. y LOTINA-HENNSEN, B. The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C₃ and a C₄ plant. Plant cell physiology. [En línea]. 1989. Vol. 30, no. 5 [Citado 03 Agosto de 2010], p. 609 - 616. Disponible en internet en: <http://pcp.oxfordjournals.org/content/30/5/609.full.pdf>

STOVANOVA, D. y VELIKOVA, V. Effects of simulated acid rain on chloroplast ultrastructure of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Biologia plantarum. [En línea], 1997/98. Vol. 40, no. 4. [Citado 03 Octubre 2010], p. 589 – 595. Disponible en Internet en: <http://www.springerlink.com/content/u0u74047589mqI9r/fulltext.pdf>

THOMPSON, William W. The Ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* Chloroplasts. Journal of experimental botany. [En línea], 1965. Vol. 16, no. 1 [Citado 13 Octubre 2010], p. 169 - 176. Disponible en internet en: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/16/1/169.full.pdf+html>

UENO, Osamu, KAWANO, Yukiko, WAKAYAMA, Masataka y TAKEDA Tomoshiro. Leaf vascular systems in C₃ and C₄ grasses: A two-dimensional análisis. Annals of botany, [En línea]. 2006. Vol. 97 [Citado 30 Junio 2009], p. 611 – 621. Disponible en internet en: <http://www.aob.oxfordjournals.org>

UENO O. y SENTOKU N. Comparison of leaf structure and photosynthetic characteristics of C₃ and C₄ *Alloteropsis semialata* subspecies. Plant cell environ. [En línea] Febrero, 2006, Vol. 29, no 2 [Citado 24 Marzo 2010], p. 257 - 268. Disponible en internet en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

WHITE, Jeffrey W y MONTES-R., Consuelo. Variation in parameters related to leaf thickness in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). . Field crops research. [En

línea] Jun 2005. Vol. 91, no. 1 [Citado 13 Agosto 2010], p. 7-21. Disponible en internet en: <http://www.sciencedirect.com/science>

WILHEM TRISSL, Hans. y WILHEM, Christian. Why do thylakoids membranes from higher plants form grana stacks? Trends in biochemical sciences. [En línea] Nov. 1993. Vol. 18, no. 11. [Citado 17 Octubre 2010], 415-419, Disponible en internet en: <http://www.sciencedirect.com/science>