

PROYECTO FIN DE MASTER  
EN INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO  
NATURAL

Aplicación de técnicas de microscopía a la  
determinación de cambios anatómicos  
derivados del déficit de hierro en *Medicago  
truncatula*

AUTORA: Dido Villarroya Lacarta

TUTOR: Dr. Javier Abadía Bayona

PONENTE: Dra. M<sup>a</sup> Luisa Peleato Sánchez

Zaragoza, 29 de Noviembre de 2012



## **Autorización presentación de tesis master**

D. JAVIER ABADÍA BAYONA, Profesor de Investigación del Consejo de Investigaciones Científicas (CSIC)

AUTORIZA:

La presentación de la siguiente memoria de Tesis Master, titulada, “APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA A LA DETERMINACIÓN DE CAMBIOS ANATÓMICOS DERIVADOS DEL DÉFICIT DE HIERRO EN *Medicago truncatula*” presentada por D<sup>a</sup>. Dido Villarroya Lacarta para optar al grado Master en Iniciación a la Investigación en Ciencias Agrarias y del Medio Natural por la Universidad de Zaragoza, y certifica que ha sido realizada bajo mi dirección en la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC).

Y para que conste en a los efectos oportunos expido la presente autorización

En Zaragoza a 29 de noviembre de 2012

Fdo. Javier Abadía Bayona

Esta tesis master ha sido financiada por el proyecto de investigación AGL2010-16515 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) titulado ‘Metalómica vegetal: una aproximación a la homeostasis de metales en plantas mediante espectrometría de masas integrada’.

## **Agradecimientos**

*Mi agradecimiento al grupo de Fisiología de Estrés Abiótico en Plantas de la Estación Experimental sin cuyos medios este trabajo no habría sido posible, en especial a Ana y Juanjo por su ayuda de última hora y a mis compañeros de laboratorio por su colaboración desinteresada y su amistad.*

*También agradecer a la Unidad de Recursos Forestales del CITA, Eustaquio, Domingo y J, su indispensable apoyo y sabiduría.*

*Y, por supuesto, a mis padres por todo, a Carlos por estar siempre a mi lado, a mis amigos por los buenos momentos y a Borris por su mundo paralelo.*

# Índice

Resumen .....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Concepto de esencialidad y el Hierro .....	3
1.1.1 Papel del Fe en las plantas .....	3
1.1.2 El Fe en el suelo .....	3
1.1.3 Causas de la deficiencia de Fe .....	4
1.1.4 Absorción del Fe por la raíz .....	5
1.1.5 Respuestas de las plantas ante la deficiencia de Fe .....	5
1.2 La microscopía como técnica resolutive .....	8
1.2.1 Microscopio óptico .....	9
1.2.2 Microscopio de fluorescencia.....	10
1.3 Medicago truncatula como planta modelo.....	11
2. Objetivo .....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1 Condiciones de cultivo .....	15
3.2 Preparación de las muestras para microscopía .....	16
3.2.1 Inclusión en agar.....	17
3.2.2 Inclusión en resina epoxi .....	17
3.2.3 Inclusión en parafina .....	18
3.3 Tinción de las muestras .....	20
3.3.1 Tinción de Johansen .....	20
3.3.2 Safranina.....	21
3.3.3 Floroglucinol .....	22
3.4 Toma de imágenes .....	22
4. Resultados.....	23
4.2 Estado de las planta en el momento del muestreo. ....	23
4.3 Estudio histológico .....	25
5. Discusión .....	31
6. Adecuación de las técnicas de microscopía para la tinción de lignina en tejidos de <i>M. truncatula</i> .....	33
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía.....	36
Anexo I.....	40

## Resumen

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para la vida de las plantas y el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. Sin embargo, la deficiencia de Fe es uno de los factores más limitantes de la producción agrícola, especialmente en suelos calizos. En condiciones de deficiencia de Fe, las plantas como *Medicago truncatula* desarrollan una serie de cambios adaptativos a nivel fisiológico, morfológico y metabólico. Estudios previos en esta especie mostraron que la deficiencia de Fe induce alteraciones en la abundancia de proteínas de la ruta de los fenilpropanoides de la cual deriva la lignina. En este trabajo se utilizaron distintas técnicas de microscopía, tanto óptica como de fluorescencia, para identificar posibles modificaciones en la lignificación en esta especie como respuesta a la deficiencia de Fe, con o sin la presencia de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en el medio de cultivo. Cortes de raíz, tallo y peciolo se estudiaron mediante microscopía de autofluorescencia, y con las tinciones de safranina, floroglucinol y Johansen. La tinción con floroglucinol y la auto-fluorescencia, en general, resultaron adecuadas para evaluar los cambios en la lignificación. Los tejidos nuevos, como la raíz y el peciolo crecidos durante el periodo de deficiencia de Fe, mostraron una reducción de la lignificación. Por el contrario, cuando la deficiencia de Fe fue acompañada de  $\text{CaCO}_3$  se observó un aumento de la lignificación del peciolo.

# **1. Introducción**

## **1.1 Concepto de esencialidad y el Hierro**

En las plantas, además de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>) y agua, son necesarios elementos minerales esenciales para un correcto desarrollo del ciclo vital (Barker y Pibeam, 2006). Estos elementos esenciales se clasifican en macronutrientes y micronutrientes en función de la cantidad requerida por la planta. Muchos de los micronutrientes pertenecen al grupo de los metales pesados como el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el cinc (Zn), el níquel (Ni) y el molibdeno (Mo) siendo imprescindibles para funciones vitales como, entre otras, la fotosíntesis y la respiración (Marschner, 1995).

### ***1.1.1 Papel del Fe en las plantas***

El Fe es un micronutriente esencial para las plantas, ya que es un constituyente indispensable de un gran número de enzimas y agentes redox que intervienen en algunas de las principales funciones del metabolismo de los seres vivos. La gran versatilidad del Fe en sus funciones biológicas es debida al potencial del par redox Fe(III)/Fe(II), que varía dependiendo del ligando al que se encuentre unido, permitiendo así su uso en forma de grupos hemo o cluster Fe-S. Así, el Fe interviene en las síntesis de clorofila y es esencial para la fotosíntesis y el mantenimiento de la estructura del cloroplasto (Abadía y Abadía, 1993). Además, interviene en procesos como la respiración, la fijación de nitrógeno (Clark, 1983) y en la síntesis de DNA y hormonas (Briat y Lobréaux, 1997). Aproximadamente un 63% del hierro de la hoja está asociado a proteínas, y un 80% del total está localizado en los cloroplastos (Young y Terry, 1982).

### ***1.1.2 El Fe en el suelo***

El Fe es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. Sin embargo, en suelos alcalinos y calcáreos se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos de muy baja solubilidad, provocando una baja biodisponibilidad para las plantas. Los factores que causan la deficiencia de este elemento son, entre otros: un pH elevado, altas cantidades

de arcillas y carbonatos (Kashirad y Marschner, 1974), mucha humedad, salinidad y altas cantidades de fosfatos (Lindsay y Schwab, 1982).

### ***1.1.3 Causas de la deficiencia de Fe***

La deficiencia de Fe está muy extendida, ya que afecta a una gran variedad de especies agrícolas como soja, cacahuete, judía, sorgo, arroz, cítricos, melocotonero, vid y tomate, y afecta a muchos países como España, Francia, Italia, Turquía, EE.UU., China, Japón, etc. En el área mediterránea afecta a un alto porcentaje de las plantaciones de especies frutales (Sanz et al., 1992; Tagliavini et al., 2000). Sólo en la cuenca del Ebro se estimó en más de 13 millones de euros por año el gasto que suponen los tratamientos correctores de esta deficiencia (Sanz et al., 1992). La falta de corrección de esta alteración en cultivos frutales afecta el crecimiento de los árboles, ya que la floración es más escasa y los frutos son menos numerosos y más pequeños, pudiéndose llegar en casos extremos a la muerte prematura del árbol.

La deficiencia de Fe en la planta no sólo puede estar producida por factores que afecten a su disponibilidad si no también a su absorción radicular y a su movilidad dentro de la planta. Aunque la absorción a nivel radicular depende principalmente de las características del suelo (ver apartado 1.1.2.), otros factores pueden también afectar a la disponibilidad del Fe como la compactación y el encharcamiento del suelo (Chen y Barak, 1982; Chaney, 1984), las bajas temperaturas y los herbicidas (Chaney, 1984), debido a que pueden dificultar el desarrollo radicular. La deficiencia de Fe puede ser también causada por una baja movilidad del Fe en la planta, lo que se hace patente en estudios que muestran que el contenido de Fe en hojas cloróticas de plantas deficientes puede ser similar o incluso algo superior al de las hojas verdes no deficientes (Morales et al, 1998; Römheld, 2000), lo que podría indicar que el Fe se encuentra acumulado en unas formas no utilizables por la planta. Tanto la presencia de fosfatos como un elevado pH del apoplasto son factores que podrían provocar su precipitación en el exterior de las células impidiendo su utilización (Mengel y Geurtzen, 1986). Sin embargo, la razón de la existencia de éste fenómeno, conocido como la “paradoja de la clorosis férrica”, es aún desconocida (Tomasi et al., 2009; Jimenez et al., 2009).



### ***1.1.4 Absorción del Fe por la raíz***

Las plantas se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su mecanismo de absorción del Fe por la raíz (Abadía et al., 2011):

- **La Estrategia I o reductora**

Las plantas de Estrategia I (dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas) reducen el Fe(III) a Fe(II) para su posterior absorción. Este mecanismo consta de al menos tres componentes principales: una reductasa férrica de membrana perteneciente a la familia FRO (Ferric Reductase Oxidase) (Robinson et al., 1999), un transportador específico de Fe(II) perteneciente a la familia ZIP (ZNT-IRT like protein) de transportadores de metales (AtIRT1, Eide et al., 1996; Fox y Guerinot, 1998) y una H<sup>+</sup>-ATPasa que disminuye el pH de la rizosfera (Santi y Schmidt, 2009).

- **La Estrategia II o quelante**

Las plantas de Estrategia II absorben el Fe en forma de quelato de Fe(III). A este grupo pertenecen las gramíneas, cuyas raíces sintetizan y excretan compuestos de bajo peso molecular que son péptidos de aminoácidos no proteogénicos, derivados del ácido mugineico, llamados fitosideróforos (PS). Éstos son excretados por transportadores específicos (HvTOM1, Transporter Of Mugineic acid family phytosiderophores 1, Nozoye et al., 2010) y debido a su alta afinidad por el Fe lo solubilizan de forma muy eficaz por quelación, produciendo complejos Fe(III)-fitosideróforo que son introducidos al interior de la raíz a través de transportadores específicos situados en la membrana plasmática (ZmYS1; Yellow Stripe).

### ***1.1.5 Respuestas de las plantas ante la deficiencia de Fe***

Las plantas deficientes en Fe muestran diversos síntomas, siendo el más visual el amarilleamiento de las hojas jóvenes denominado clorosis férrica (Terry y Abadía, 1986), que se debe a un cambio en la composición pigmentaria de los cloroplastos de las hojas (Morales et al., 1990, 1994; Abadía y Abadía, 1993). En casos extremos, la hoja

puede adquirir prácticamente color blanco y presentar necrosis, pudiendo incluso ocurrir la muerte de la planta.

Las plantas deficientes en Fe desarrollan una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y metabólicos destinados a aumentar la eficiencia en la adquisición de este elemento y adaptarse a la baja disponibilidad del mismo. Estos cambios difieren según el grupo al que pertenezca la planta, conociéndose dos mecanismos:

- **Estrategia I**

**Cambios morfológicos:**

Los cambios morfológicos más destacados van encaminados al aumento de la superficie de contacto entre la raíz y el suelo. Se produce una disminución en el crecimiento de la raíz primaria (Hutchinson, 1967; Römheld y Marschner, 1981) acompañada por un aumento en el número de raíces laterales (Moog et al., 1995; Pinton et al., 1998), un engrosamiento de las puntas apicales (Wei et al., 1997) debido a un incremento del tamaño de las células corticales y a un mayor número de células en la rizodermis e hipodermis, ocurriendo en algunas especies un amarilleamiento de las raíces. El engrosamiento coincide espacialmente con aquellas zonas donde se produce la inducción en la reducción de Fe (Bell et al., 1988) y la extrusión de protones (Alcántara et al., 1991). Además, existen cambios microscópicos que consisten en la formación de células de transferencia, tanto en la rizodermis como en la hipodermis, aumentando así la superficie de contacto entre la pared celular y el citoplasma (Welkie y Miller, 1993). Recientemente, se ha hecho un estudio comparativo de dos genotipos vegetales usados como patrones en peral, la variedad ‘Conferencia’ (*Pyrus communis*, tolerante a la deficiencia inducida por carbonato) y el patrón membrillero BA29 (*Cydonia oblonga*, susceptible). Imágenes de microscopio muestran que, al someter estos dos cultivares a estrés por deficiencia, se produce un incremento en la lignificación de las paredes celulares de la raíz, localizado específicamente en las células del cilindro vascular, de la endodermis y de la sub-epidermis, que por el contrario no se observa en el cultivar tolerante ‘Conferencia’ (Donnini et al., 2010).

### **Cambios fisiológicos**

Los cambios en la fisiología de las raíces a nivel bioquímico para aumentar la eficiencia de la absorción de Fe consisten en inducir todos los mecanismos de la Estrategia I, como un aumento de la actividad reductasa férrica de la raíz, un aumento de la extrusión de protones y un aumento en la expresión del transportador de Fe(II) de la familia ZIP (IRT). Además, muchas especies son capaces de exportar a la rizosfera compuestos de bajo peso molecular, incluyendo fenoles, ácidos orgánicos y flavinas (Cesco et al. 2010).

### **Reorganización del metabolismo**

Para mantener la activación de los procesos de reducción y excreción de protones bajo condiciones de deficiencia de Fe, se incrementan las tasas de regeneración de NAD(P)H y ATP. Tanto la proporción NADPH: NADP<sup>+</sup> (Sijmons et al., 1984; Schmidt y Schuck, 1996) como la concentración de ATP (López-Millán et al., 2000; Espen et al., 2000) son más altas en condiciones de deficiencia en especies como judía (*Phaseolus vulgaris*), llantén (*Plantago lanceolata*), remolacha (*Beta vulgaris*) y pepino (*Cucumis sativus*).

En deficiencia de Fe, la tasa de oxígeno consumido por las raíces aumenta (López-Millán et al., 2000; Espen et al., 2000). Es difícil asociar esta mayor utilización de oxígeno únicamente a la cadena oxidativa de transporte electrónico, ya que también están presentes rutas oxidativas alternativas (López-Millán et al., 2000). Este mayor consumo de oxígeno se ha relacionado con un elevado número de mitocondrias y no con un incremento de su actividad.

Esta deficiencia también provoca una disminución de la cantidad de enzimas que contienen Fe, entre ellas varias pertenecientes a la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Por ello, se ha propuesto la existencia de un sistema oxidativo alternativo en la membrana mitocondrial que compensaría el par NAD(P)H/NAD(P) (Vigani et al., 2009).

- **Estrategia II**

Las plantas de Estrategia II, cultivadas en condiciones de deficiencia de Fe, aumentan la producción y excreción de fitosideróforos, relacionándose su cantidad y clase con la tolerancia al déficit de este elemento.

Las estrategias de reducción o quelación para la adquisición de Fe por parte de la planta no son mutuamente excluyentes. Se ha visto que en condiciones de deficiencia tanto arroz como cebada aumentan la adquisición de hierro en forma de Fe(III)-PS, pero también aumentan la expresión del transportador de Fe(II), el IRT1 (Ishimaru et al., 2007; Pedas et al., 2008). A pesar de ello, el arroz no puede llevar a cabo la reducción del Fe(III), lo que sugiere que la expresión de IRT1 se debe más a una adaptación a las condiciones de los suelos, inundados y pobres en oxígeno, donde los niveles de Fe(II) libre pueden ser altos (Walker y Connolly, 2008).

## **1.2 La microscopía como técnica resolutive**

La capacidad del ojo humano es limitada a la hora de estudiar lo pequeño. La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visibles los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal.

El microscopio es el elemento central de la microscopía, pero su uso requiere de todo un conjunto de métodos y técnicas afines pero extrínsecas al aparato. Algunas de ellas son, técnicas de preparación y manejo de los objetos de estudio, técnicas de salida, procesamiento, interpretación y registro de imágenes, etc.

El impulsor de la microscopía fue Anton van Leeuwenhoek (Holanda, 1632-1723), anatomista y fisiólogo que construyó sus primeros microscopios con lentes convexas que él mismo pulía. Consiguió que éstas fueran lo suficientemente poderosas como para observar bacterias, hongos y protozoos. Zacarías Janssen construyó el primer microscopio que puede considerarse compuesto porque constaba de dos lentes, pero los verdaderos avances en este aparato fueron desarrollados por Robert Hooke, que lo utilizaba para estudiar cortes de corcho, describiendo pequeños poros en forma de caja a los que él llamó "células". A partir de éste, los avances tecnológicos permitieron llegar a los modernos microscopios de nuestro tiempo.

Existen muchos tipos de microscopio, pero en este trabajo únicamente se van a utilizar el óptico y el de fluorescencia, que se describen a continuación.

### ***1.2.1 Microscopio óptico***

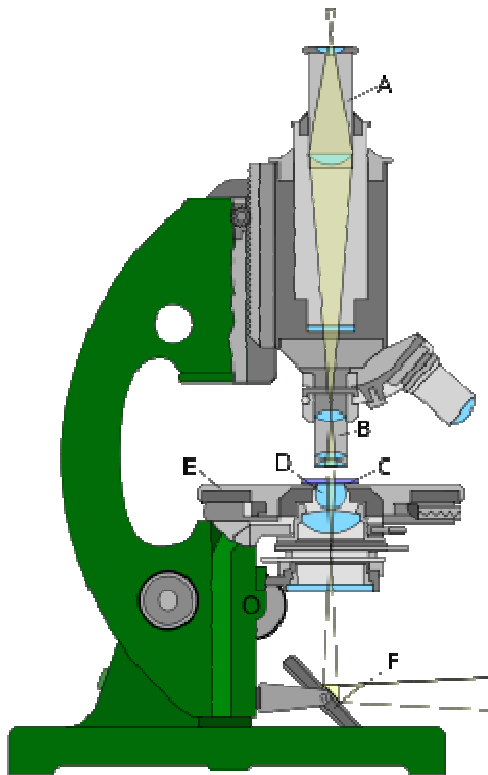
La microscopía óptica consiste en hacer pasar luz visible de una fuente a través de lentes simples o múltiples para lograr una vista ampliada de la muestra. La imagen resultante puede ser detectada directamente por el ojo humano, impresa en una placa fotográfica o registrada y mostrada.

La fuente de luz proporciona la iluminación de la muestra, bien mediante un espejo que concentra la iluminación natural o bien mediante un sistema de iluminación eléctrico. A continuación, una lente o conjunto de lentes llamada condensador concentra la luz sobre la muestra. La intensidad de ésta se regula con la variación en la apertura numérica del diafragma, situado debajo de la platina y del condensador.

El microscopio óptico puede ser:

**Microscopio simple**, también llamado lupa, que consta de una única lente o un sistema de lentes convergentes que proporcionan una imagen virtual aumentada del objeto colocado entre la lente y el foco.

**Microscopio compuesto**, que combina dos lentes o sistemas de lentes que se sitúan en los extremos de un tubo (Figura 1). El extremo más próximo al objeto es el objetivo, mientras que el más cercano al ojo es el ocular. Los objetivos se disponen en una pieza giratoria denominada revólver y producen el aumento de las imágenes.



Microscopio óptico.Descripción:

- A) ocular
- B) objetivo
- C) portador del objeto
- D) lentes de la iluminación
- E) sujeción del objeto
- F) espejo de la iluminación

**Figura 1:** Descripción de las partes del microscopio óptico  
 ([http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_%C3%B3ptico](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_%C3%B3ptico))

### 1.2.2 Microscopio de fluorescencia

Este tipo de microscopio se caracteriza por el uso de fluorescencia. Ésta es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte ella a una longitud de longitud de onda diferente. La energía emitida en forma de luz es menor que la energía total absorbida, por lo que la longitud de onda de emisión será mayor.

En general, las sustancias fluorescentes absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta (radiación gamma, rayos X, UV, luz azul, etc.), y luego la emiten nuevamente a una longitud de onda más larga, por ejemplo dentro del espectro visible. En el microscopio de fluorescencia los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda y la imagen observada es el resultado de la radiación

electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda.

Este tipo de microscopios consta de una fuente de luz que emite en una banda de longitudes de onda desde el ultravioleta al infrarrojo, un filtro que delimita la banda de excitación deseada y un segundo filtro (barrera) que corta los restos de luz de excitación y permitiendo la observación de la luz emitida únicamente.

### **1.3 *Medicago truncatula* como planta modelo**

*Medicago truncatula* es una leguminosa anual perteneciente al género de las *fabaceae*. Crece en climas templados con temperaturas entre 15°C-25°C, con veranos secos y calurosos e inviernos suaves y húmedos, con precipitaciones entre 250 y 600 mm anuales. Es originaria de los países de la región mediterránea, especialmente Asia occidental (Lesins y Lesins, 1979), aunque también está naturalizada al sur de Australia desde el s.XIX, y también puede encontrarse en otras regiones con clima templado como Sudáfrica y Chile.

Morfológicamente, la planta está formada por un eje principal que se organiza en forma de roseta, es decir, las hojas están a nivel del cuello con entrenudos muy cortos, o como un eje alargado y en ramas de diferentes órdenes (primaria, secundaria..., etc.) siendo su morfología muy dependiente de las condiciones ambientales (Aitken, 1955). Las hojas son trifoliadas, compuestas por un peciolo, tres valvas que son dentadas en su parte superior y vellosas, a veces con una mancha oscura en el centro y dos estípulas basales cuya función es la de proteger la yema axilar.

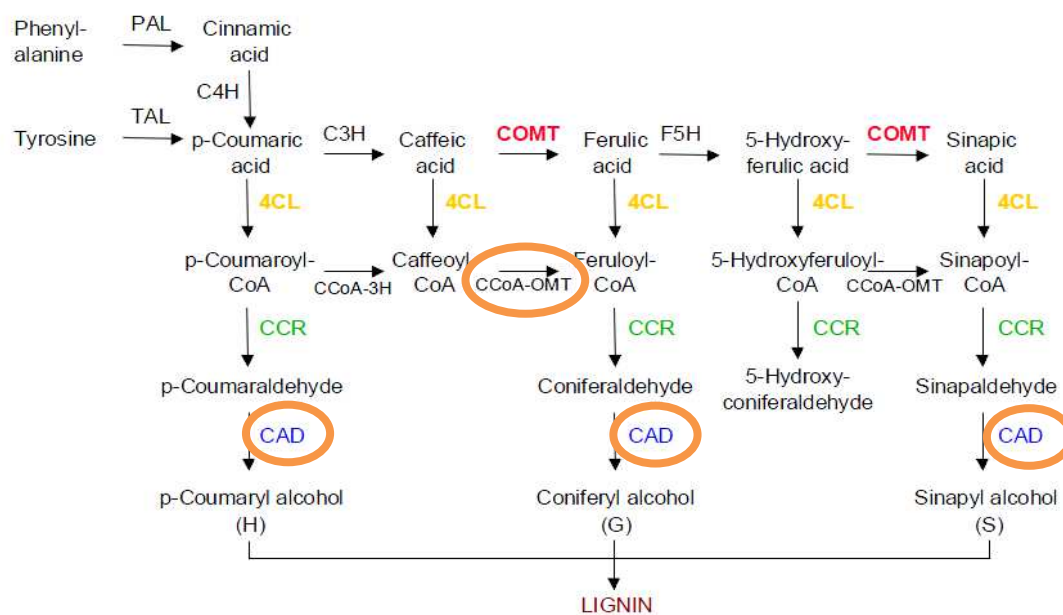
Como la mayoría de las plantas modelo tiene un crecimiento muy rápido, un periodo corto de crecimiento, es de tamaño adecuado para la realización de estudios fisiológicos, y se autopoliniza. Por este hecho, ya ha sido objeto de estudio en diversos trabajos del grupo de investigación Fisiología de Estrés Abiótico en Plantas en la Estación Experimental de Aula Dei, donde se llevó a cabo este proyecto. Por ejemplo, se han caracterizado las respuestas de las raíces de *Medicago truncatula* a la deficiencia de Fe con el fin de utilizarla como nuevo modelo para el estudio de este estrés nutricional en plantas. En estos estudios, las plantas se cultivaron en condiciones de suficiencia y deficiencia de Fe, midiéndose la evolución de algunas de las respuestas características de la Estrategia I a

lo largo del tratamiento desde un punto de vista fisiológico (Andaluz et al., 2009; Rodríguez-Celma, 2011). En base a los resultados obtenidos, *M. truncatula* parece ser una buena candidata para el desarrollo de este tipo de estudios y sirve como planta modelo de Estrategia I complementaria *Arabidopsis thaliana*, ya que *M. truncatula* acumula en raíz y exuda a la rizosfera flavinas en respuesta a la deficiencia de Fe, cosa que no hace *A. thaliana*.

En esta línea, estudios del proteoma de esta especie, han mostrado que la deficiencia de Fe junto con la presencia de  $\text{CaCO}_3$ , incrementaba la cantidad de algunas enzimas involucradas en la formación de la lignina, que se describe en la Figura 2 (Rodríguez-Celma et al., en preparación). Concretamente, cambian la abundancia relativa de la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la cafeoyl-CoA o metiltransferasa, lo que sugiere un posible cambio del perfil de la lignificación.

La lignina es un polímero complejo, que forma parte de las paredes celulares junto a la celulosa (Jones et al. 2001), y está formada por la combinación de subunidades, en las que dependiendo del precursor se pueden distinguir tres tipos: H-lignina, S-lignina y G-lignina (Vogt, 2010). Todas estas subunidades son sintetizadas mediante la ruta del metabolismo secundario de los fenilpropanoides. Tienen algunas características importantes como son la impermeabilidad y también emiten fluorescencia cuando se excitan a determinadas longitudes de onda. Se requiere de un importante gasto energético para su formación y por tanto los cambios fisiológicos en la planta que afectan a su capacidad fotosintética pueden afectar tanto a la formación de las mismas como a su distribución. Por otro lado, la lignina es un constituyente del tejido de soporte, ya que da rigidez a las paredes celulares, lo que puede afectar a su crecimiento (Vogt, 2012).





**Figura 2:** Ruta de síntesis de la lignina, donde las enzimas son: PAL phenylalanine ammonia-lyase; TAL tyrosine ammonia-lyase; C4H cinnamate 4-hydroxylase; C3H 4-hydroxycinnamate 3-hydroxylase; COMT caffeic acid 3-O-methyltransferase; F5H ferulate 5-hydroxylase; 4CL 4-coumarate: CoA ligase; CCoA-3H coumaroyl-coenzyme A 3-hydroxylase; CCoA-OMT caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase; CCR cinnamoyl-CoA reductase; and CAD cinnamyl alcohol dehydrogenase (Spangenberg et al. 2000). En círculos se muestran las enzimas que aumentaron su abundancia relativa en respuesta a deficiencia de Fe en *M. truncatula* (Rodríguez-Celma *et al.* en preparación).

## **2. Objetivo**

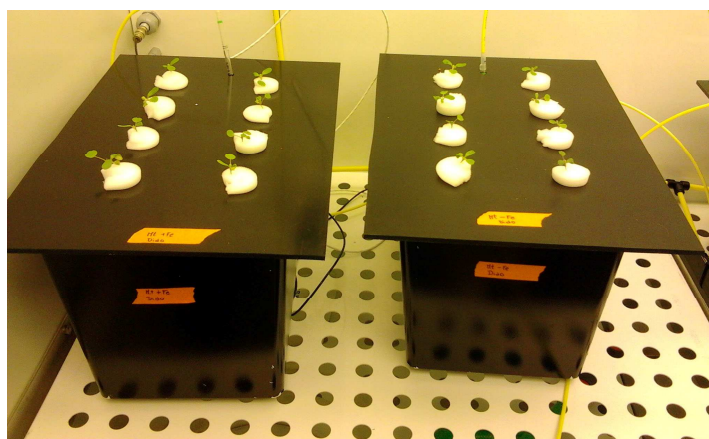
En base a lo descrito anteriormente, y con el fin de corroborar algunos de los cambios observados en el proteoma de *M. truncatula* en respuesta a la deficiencia de Fe, el objetivo de este trabajo fue:

“Evaluar de los cambios inducidos por la deficiencia de hierro en la lignificación de las paredes celulares en diferentes tejidos de *Medicago truncatula*, mediante la observación por la aplicación de técnicas de microscopía”.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Condiciones de cultivo

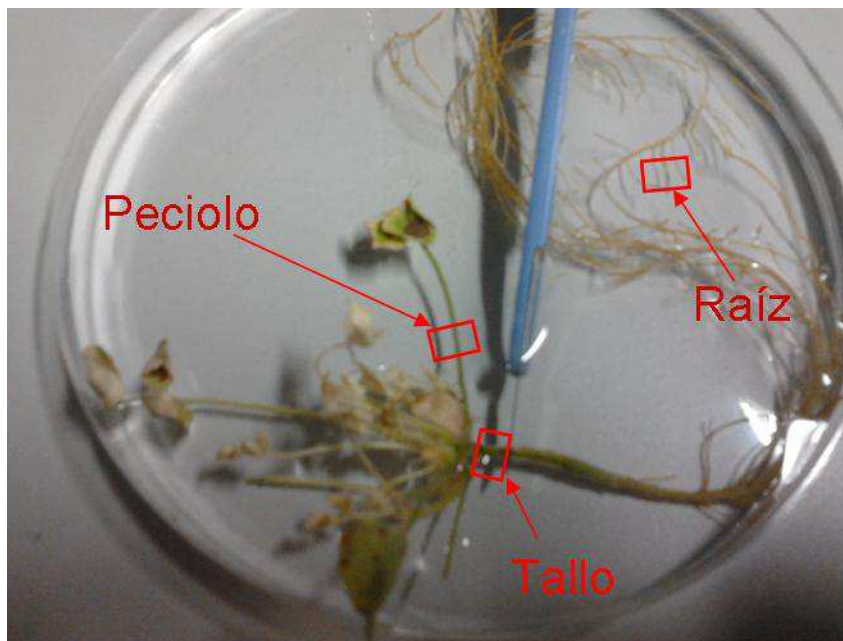
Plantas de *Medicago truncatula* cv. "Jemoalong" se cultivaron según las condiciones descritas por Rodríguez-Celma et al. (2011). Las semillas se escarificaron con un bisturí y se germinaron en un matraz erlenmeyer con agua destilada durante 24 h, en agitación y oscuridad. A continuación, se pasaron a sobres de germinación durante 3 días, manteniéndose también en oscuridad. Posteriormente, las plántulas se pre-cultivaron en hidroponía con solución nutritiva Hoagland al 50% (v/v), que contiene: 0.6 mM de  $K_2SO_4$ , 0.5 mM de  $Ca(NO_3)_2$ , 1.0 mM de  $NH_4NO_3$ , 0.3 mM de  $KH_2PO_4$ , 0.2 mM de  $MgSO_4$  y 25  $\mu M$  de  $CaCl_2$ , 25  $\mu M$   $H_3BO_3$ , 2  $\mu M$  de  $MnSO_4$ , 2  $\mu M$  de  $ZnSO_4$ , 0.5  $\mu M$  de  $CuSO_4$ , 0.5  $\mu M$  de  $H_2MoO_4$ , 0.1  $\mu M$  de  $NiSO_4$  y 20  $\mu M$  Fe(III)-EDTA. Las plantas permanecieron en contenedores de 10 L (Figura 3) y creciendo en cámaras de cultivo durante 12 d. Las condiciones de luz, humedad relativa y fotoperiodo fueron: 23°C durante 16 h de luz y a 19°C en 8 h de oscuridad. Transcurrido ese periodo, se iniciaron los tratamientos que fueron: i) deficiencia de Fe (0  $\mu M$  Fe, pH 5,5) y ii) deficiencia de Fe en presencia de carbonato cálcico (0  $\mu M$  Fe + 1 g  $L^{-1}$   $CaCO_3$ , pH 7,7). Además, otras plantas se crecieron en condiciones control (45  $\mu M$  Fe(III)-EDTA y sin  $CaCO_3$ ). Tras 6 días de tratamiento se tomaron muestras de tallo, raíz y peciolo. Este experimento se repitió 3 veces con 8 plantas por tratamiento.



**Figura 3.** Plantas de *Medicago truncatula* en crecimiento en la cámara de cultivo en el momento de la aplicación de los tratamientos.

### 3.2 Preparación de las muestras para microscopía

Tras la recolección, las muestras del tallo, peciolo y raíces laterales cultivadas en los distintos tratamientos, se cortaron con un bisturí bajo el agua para evitar su deshidratación. En total se hicieron 8 repeticiones de 8 plantas en cada uno de los tratamientos. Las partes que se tomaron de cada uno de los tejidos se muestran en la Figura 4.



**Figura 4.** Partes muestreadas de raíz, tallo y peciolo de *Medicago truncatula*.

Para seccionar el tallo evitando cortar parte de la raíz principal, las secciones fueron de aproximadamente 1 cm de longitud, tomándose de la parte basal de la planta, justo antes de las ramificaciones de los peciolos (Figura 4).

En cuanto al peciolo, en todas las plantas se siguió el mismo patrón de muestreo, cogiendo aproximadamente 1-2 cm de la parte central de aquellos peciolos más adultos que mostraran síntomas de deficiencia (Figura 4).

En cuanto a las raíces, en plantas '-Fe' y '-Fe + CaCO<sub>3</sub>' se muestrearon tomando 1 cm de la parte subapical de los pelos radiculares que mostraban amarilleamiento (Figura 4). En las plantas control se tomaron de la parte subapical de las raíces secundarias.

### 3.2.1 Inclusión en agar

Algunas muestras de cada tejido fueron incluidas en agar, preparado al 5% en estado semisólido a 48°C para evitar el choque térmico de los tejidos, y disponiéndolas verticalmente para dejarlas bien posicionadas. Una vez incluidas en el agar, se dejaron enfriar en la cámara fría durante dos horas a 4°C con el fin de solidificar el agar y dejarlo listo para el corte.

Una vez frías las muestras se cortaron con el uso de un vibratomo (VT1000 S, Leica Microsystems GmbH; Figura 5) siguiendo las indicaciones de Ojeda-Barrios et al. (2011). Los cortes fueron de 60 µm.



**Figura 5.** Vibratomo VT1000 Leica.

(<http://www.leicabiosystems.com/products/sectioning/vibrating-blade-microtomes/details/product/leica-vt1000-s/>).

### 3.2.2 Inclusión en resina epoxi

Muestras de tallo, peciolo y raíz fueron incluidas en resina epoxi. Para ello, la preparación de la resina se hizo de la siguiente manera:

Mezcla A (13 ml): 39% de Epoxi Embedding Medium + 61% de DDSA

Mezcla B (15 ml): 53% de Epoxi Embedding Medium + 47% de NMA

Una vez realizadas las mezclas A y B se mezclaron entre sí y a la solución final se le añadieron 16 gotas de DMP-30. La concentración final de DMP-30 fue 1.5–2.0% (v/v).

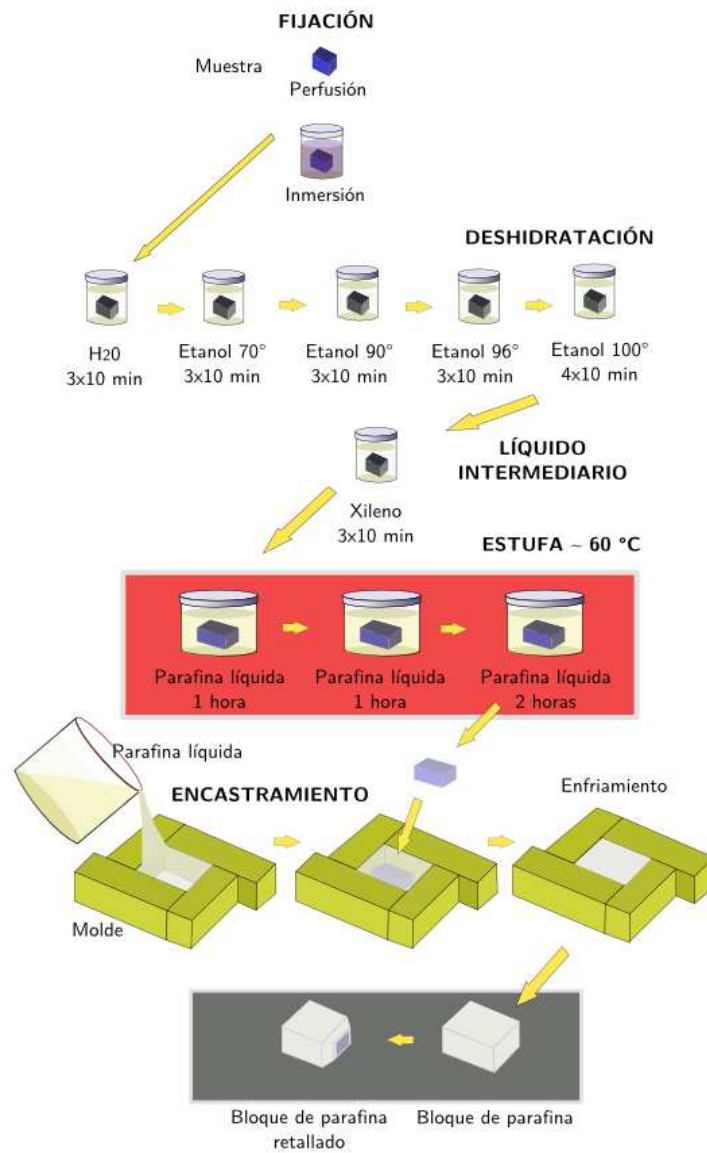
Para la inclusión en resina epoxi, las muestras fueron deshidratadas mediante una serie de acetona: 30% (v/v) 10 min, 60% (v/v) 10 min y 90% (v/v) 10 min. Después fueron sumergidas tres veces en acetona 100% durante 10 min, cambiando la solución cada vez.

Tras la deshidratación, las muestras se sumergieron en una mezcla 1:1 (acetona:epoxi) durante 30 min. A continuación se trasladaron a una solución acetona:epoxi en proporción 1:2 dónde permanecieron otros 30 min. Posteriormente, se rellenaron las cavidades de un molde de silicona con resina al 100% donde se colocaron las muestras cuidando que quedaran dispuestas de manera adecuada para el corte. Estos moldes se mantuvieron 12 h a 40°C y 24 h a 60°C hasta la polimerización total de la resina.

### ***3.2.3 Inclusión en parafina***

Parte de las muestras vegetales se incluyeron en parafina (Figura 6). Para este trabajo se utilizó una parafina (Tissue Embedding Medium, Paraplast Regular, Sigma) con un punto de fusión de 60°C y se siguió el protocolo de Ruzin (1999). Para ello, las muestras fueron deshidratadas previamente mediante una serie de etanol: 30 % (v/v), 50 % (v/v), 70 % (v/v) y 100% (v/v) de 30 min cada una. Seguidamente, las muestras se sumergieron en xileno, sustancia intermediaria en términos de polaridad entre el alcohol y la parafina, y para ello se realizaron 3 cambios de 10 min cada uno. Tras los últimos 10 min el material se sumergió en moldes rellenos con parafina licuada, que se mantuvo durante 2 horas en la estufa a 60°C y finalmente se enfriaron a 4°C.

Las muestras incluidas, tanto en resina como en parafina, se cortaron mediante un microtomo de deslizamiento (Microm HM 350 S; Figura 7) ya que la dureza del material así lo permitía. El grosor de corte decidido en función de la permisividad del material fue de 20 µm para la resina y de 30 µm para la parafina.



**Figura 6.** Inclusión en parafina de una muestra de tejido. (<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-parafina.php>)



**Figura 7.** Microtomo de deslizamiento HM 350 S, Microm.  
([http://www.microm.de/microm%20homepage/html/hm\\_350\\_e\\_1.html](http://www.microm.de/microm%20homepage/html/hm_350_e_1.html))

### 3.3 Tinción de las muestras

La tinción de los cortes incluidos en parafina fueron desparafinados y rehidratados según el protocolo de Ruzin (1999). Las muestras, adheridas en un portaobjetos, se sumergieron en xileno dos veces durante 10 minutos, tiempo suficiente para disolver la parafina del tejido y, a continuación, se siguió un proceso inverso a la deshidratación con una serie de alcohol de concentración decreciente: 100% (v/v) 2 min, 95% (v/v) 1 min, 70% (v/v) 1 min y 50% (v/v) 1 min.

#### 3.3.1 Tinción de Johansen

La tinción de Johansen (Johansen, 1940) utiliza el contraste entre la O safranina y el Fast-green. Este protocolo difiere de otros protocolos de tinción que utilizan estos dos colorantes en la adición de ciertos reactivos a las soluciones de tinción y limpieza que ayudan a diferenciar mejor los tejidos. La O safranina se utiliza como colorante regresivo y requiere una decoloración con hidróxido de amonio y una diferenciación con ácido pícrico para, posteriormente, teñir con Fast-green, un colorante progresivo.

En los tejidos teñidos con este método, la O safranina aparece de color rojo brillante en las paredes celulares lignificadas, suberificadas, o cutinizadas, mientras que Fast-green tiñe de color verde brillante la celulosa de las paredes celulares.



El procedimiento comenzó tiñendo con O safranina (1,0% p/v) durante 2 h y, a continuación, se lavaron las muestras con agua destilada hasta la total eliminación de los restos de safranina sobre el portaobjetos. Posteriormente, se hizo una diferenciación con solución de 95% etanol y 5% ácido pícrico durante 10 s para seguir con un lavado del mismo tiempo con una disolución de 95% etanol y 4 gotas de hidróxido de amonio por cada 100 ml de disolución. El hidróxido de amonio neutraliza la acción del el ácido pícrico. Se continuó con 10 s en 100% etanol y, se prosiguió tiñendo las muestras con Fast-green (0.05% p/v) durante 15 s. Transcurrido este tiempo, se aclararon, primero, utilizando la solución 2 (ver preparación más adelante) y, seguidamente, la solución 1 (ver preparación más adelante) 10 ó 15 s con cada una de ellas. Utilizando una mezcla de xileno y unas gotas de etanol se aseguró la total eliminación de restos de agua que pudieran quedar, y se terminó con dos lavados con xileno.

Las soluciones 1 y 2 se prepararon siguiendo las proporciones indicadas a continuación:

**Solución 1:** Methyl salicilato (2 vol) + EtOH (100%) (1 vol) + Xileno (1 vol)

**Solución 2:** Solución 1 (2 vol) + EtOH (1 vol) + Xileno (1 vol)

Una vez terminado el proceso, se colocó una gota del adhesivo DPX en el cubreobjetos y se tomaron las fotografías en campo claro utilizando el microscopio indicado en el apartado 3.4.

### ***3.3.2 Safranina***

La safranina tiñe de rojo intenso las paredes celulares lignificadas y las cutículas. Para realizar esta tinción se tomo como referencia el protocolo de Johansen. En primer lugar los cortes, ya colocados sobre el portaobjetos, se tiñeron con O safranina (1.0% p/v) durante 2 horas y, a continuación, se hizo un lavado con agua destilada. Seguidamente, se diferenció mediante una solución de 95% etanol (v/v) y 5% ácido pícrico (v/v) 10-15 s. La actividad del ácido se neutralizó utilizando una solución de 95% etanol (v/v) con 4 gotas de hidróxido de amonio por cada 100 ml de disolución durante 10-15 s, y se siguió con un aclarado del mismo tiempo con etanol al 100%. Se continuó la deshidratación de las muestras con una mezcla de xileno y unas gotas de etanol, y se finalizó con dos cambios de xileno de 10 s cada uno y colocando el cubreobjetos sobre el corte utilizando DPX como adhesivo.

### **3.3.3 Floroglucinol**

El floroglucinol es un colorante específico de lignina que da a ésta una coloración roja. Para su preparación se hizo una solución saturada de floroglucinol en ácido clorhídrico al 25 %. Posteriormente, los cortes se colocaron en portaobjetos de vidrio, cubriéndolos con unas gotas de floroglucinol. La preparación se dejó incubar durante 30 min y, pasado este tiempo, se colocó sobre ella un cubreobjetos. Al no ser una coloración permanente, se tomaron las fotografías inmediatamente en campo claro con el microscopio.

## **3.4 Toma de imágenes**

Las imágenes fueron tomadas a través de un microscopio invertido (DM IL LED; Leica) equipado con una cámara fotográfica CCD (DFC 240C; Leica) y utilizando el programa informático de tratamiento de imagen Leica Application Suite V3.3.0. Las imágenes de las tinciones de Johansen, safranina y floroglucinol se tomaron en campo claro. Las imágenes de auto-fluorescencia se tomaron de cortes hechos con el vibratomo y con el microscopio, excitando a 365 nm y filtrando la luz emitida a 450 nm. Para todas las imágenes de auto-fluorescencia se mantuvieron constantes los parámetros de tiempo de exposición y gamma para evitar diferencias en la luminosidad de la señal que pudieran llevar a error a la hora de interpretar las diferencias entre tratamientos. Cabe señalar que tanto la lignina como la clorofila son compuestos auto-fluorescentes especialmente visibles al utilizar longitudes de onda de excitación en el rango entre el azul y el ultravioleta, de manera que la lignina emite señal en color azul y la clorofila en rojo (Ruzin, 1999).

## 4. Resultados

A continuación se describe el estado de las plantas de *Medicago truncatula* y los resultados del estudio histológico de raíz, tallo y peciolo de dicha especie en las condiciones de crecimiento utilizadas.

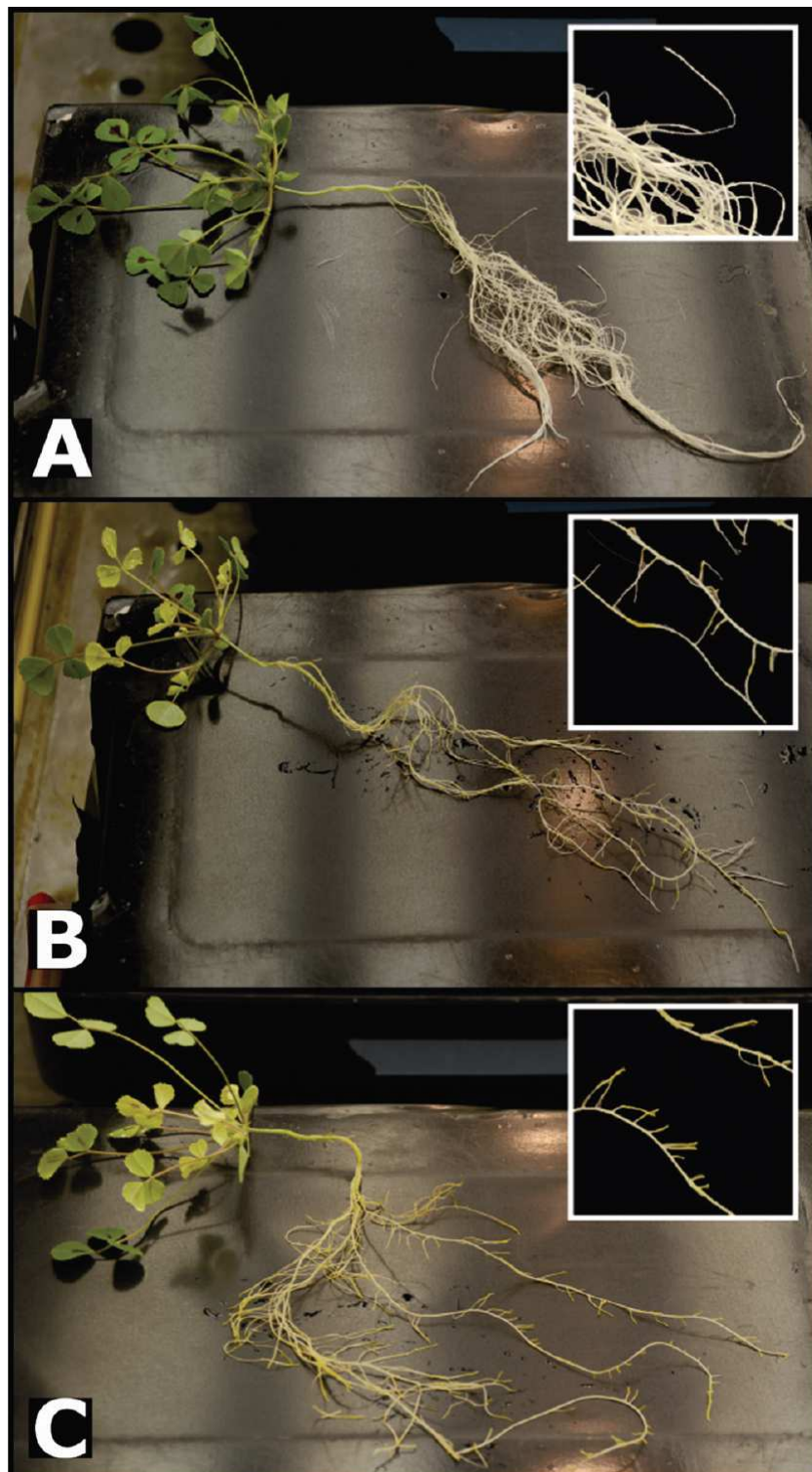
### 4.2 Estado de las planta en el momento del muestreo.

La Figura 7 muestra fotografías de las plantas de *Medicago truncatula* en el momento del muestreo, a los 6 días tras la imposición de los tratamientos. En este momento la edad de las plantas era de 21 días. Los paneles B y C muestran el estado de las plantas crecidas con 0  $\mu\text{M}$  de Fe, sin o con  $\text{CaCO}_3$  en el medio, respectivamente y el panel A muestra el aspecto de las plantas control (45  $\mu\text{M}$  Fe y sin  $\text{CaCO}_3$ ).

La deficiencia de Fe, independientemente de la presencia de carbonato en el medio, afecta al tamaño, color y morfología de las plantas, tanto a nivel radicular como en la parte aérea. Las raíces de las plantas control (Figura 7, A) son abundantes y de color blanco, mientras que las plantas deficientes en Fe (Figura 7, B y C) mostraron una raíz primaria más pequeña, un aumento del número de raíces laterales, y un engrosamiento y amarilleamiento de las puntas apicales. Este amarilleamiento de las puntas de las raíces se debe a una acumulación de riboflavina y algunos compuestos derivados de la misma que fueron recientemente identificados por Rodríguez-Celma et al. (2011) y que se observan en varias especies y/o cultivares tolerantes a la deficiencia de Fe (Rodríguez-Celma et al., 2011). Cabe destacar que las plantas deficientes en Fe y tratadas con  $\text{CaCO}_3$  (Figura 7, C) mostraron raíces laterales de menor longitud y un amarilleamiento más intenso de las puntas apicales que las plantas deficientes en Fe no tratadas con  $\text{CaCO}_3$  (Figura 7, B).

Con respecto a la parte aérea, la deficiencia de Fe (Figura 7) causó una disminución del tamaño de la parte aérea debido a que tanto los tallos como las hojas crecidos durante el periodo de deficiencia de Fe fueron más pequeños. Este efecto fue más acusado en las plantas deficientes en Fe y tratadas con carbonato (Figura 7, C). La deficiencia de Fe también causó un cambio en el color de las hojas. Mientras los tallos y hojas de las plantas control tienen una coloración verde intenso (Figura 7, A), las plantas deficientes en Fe presentan clorosis o amarilleamiento en dichos órganos (Figura 7, B y C). Este efecto fue más intenso en las plantas

deficientes en Fe y tratadas con  $\text{CaCO}_3$  (Figura 7, B *versus* C), apareciendo incluso zonas necróticas en las hojas más jóvenes.



**Figura 7.** Estado general de plantas de *Medicago truncatula* y detalle de las raíces crecidas en tratamientos: control (A), deficiente en Fe (B) y deficiente en Fe con  $\text{CaCO}_3$  en la solución nutritiva (C).

### 4.3 Estudio histológico

A continuación se describen los resultados correspondientes a las imágenes de cortes de raíz (Figura 8), tallo (Figura 9) y peciolo (Figura 10). Sólo se muestran en este apartado las imágenes de auto-fluorescencia y tinción con floroglucinol (específica de lignina) ya que la tinciones de Johansen, y safranina (ver imágenes en Anexo I) no resultaron técnicamente adecuadas o no mostraron resultados concluyentes.

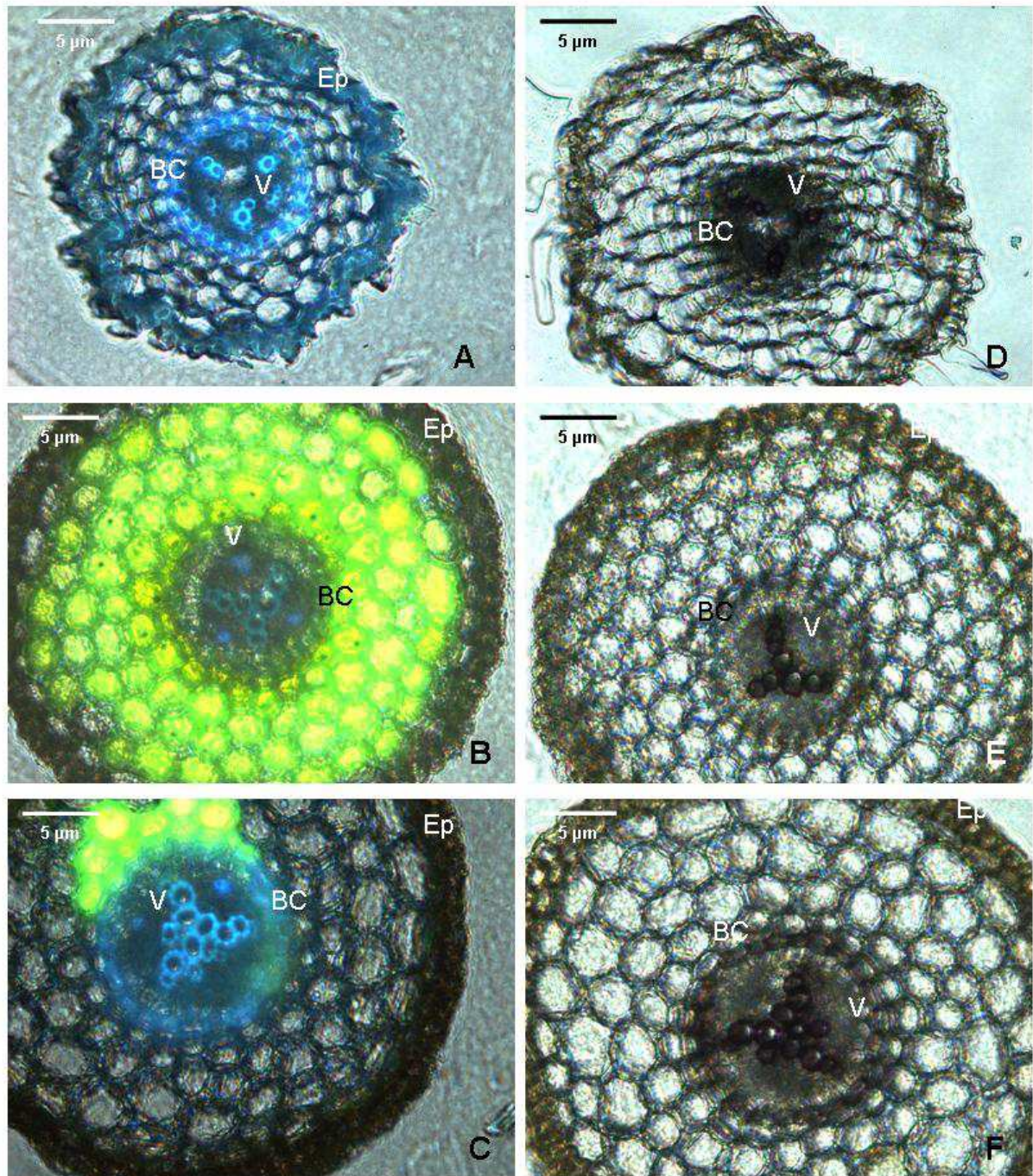
#### *Histología de la raíz*

La Figura 8 muestra cortes transversales del ápice de raíces secundarias muestreados según se indica en la Figura 4 para plantas control (A y D) y deficientes en Fe tratadas sin (B y E) o con  $\text{CaCO}_3$  (C y F). Los paneles A-C muestran la auto-fluorescencia y los paneles D-F muestran la tinción con floroglucinol.

Los cortes de las raíces de las plantas control muestran auto-fluorescencia azul (Figura 8, A), correspondiente a la lignina, localizada principalmente en los vasos xilemáticos (V) y en la banda de Caspari (BC) y en menor medida en la epidermis (Ep). La tinción con floroglucinol mostró los mismos resultados, tiñendo ligeramente la epidermis y más intensamente la banda de Caspari y el cilindro vascular (Figura 8, D). El corte presentado no permite una clara visualización de los vasos xilemáticos probablemente debido a su grosor ( $60 \mu\text{m}$ ).

El efecto más llamativo de la deficiencia de Fe en las imágenes de auto-fluorescencia de la raíz es la coloración amarilla derivada de la acumulación de flavinas en el córtex (Figura 8, B y C) ya descrita por Rodríguez-Celma et al. (2011). Es preciso señalar que las flavinas son especialmente fotosensibles, lo que produce variaciones de la auto-fluorescencia con el tiempo de exposición a la luz. Por tanto, estas imágenes de cortes de raíz fueron muy variables, dificultando la visualización de la auto-fluorescencia azul de la lignina. No obstante, se pudo observar que la deficiencia de Fe causa una desaparición de la auto-fluorescencia azul en las células de la epidermis (Figura 8, B y C versus A), corroborada por la tinción de floroglucinol (Figura 8, D-F). Respecto a la banda de Caspari y los vasos xilemáticos, la deficiencia de Fe sólo causó una disminución en la auto-fluorescencia azul cuando las plantas crecieron sin  $\text{CaCO}_3$  en el medio (Figura 8, B) que no fue observada cuando las plantas crecieron sin Fe y con  $\text{CaCO}_3$  (Figura 8, C). Este hecho fue también corroborado con la tinción de floroglucinol (Figura 8, E-F).





**Figura 8.** Cortes de raíz de *Medicago truncatula* observados a 20X. Imágenes de autofluorescencia (A-C) y de tinción con floroglucinol (D-F) de las plantas con tratamientos: control (A y D), deficiente en Fe (B y E) y deficiente en Fe con  $\text{CaCO}_3$  en el medio (C y F). Ep: epidermis; BC: bandas de Caspari; X: xilema. Los cortes se realizaron con el vibratomo a 60  $\mu\text{m}$ .

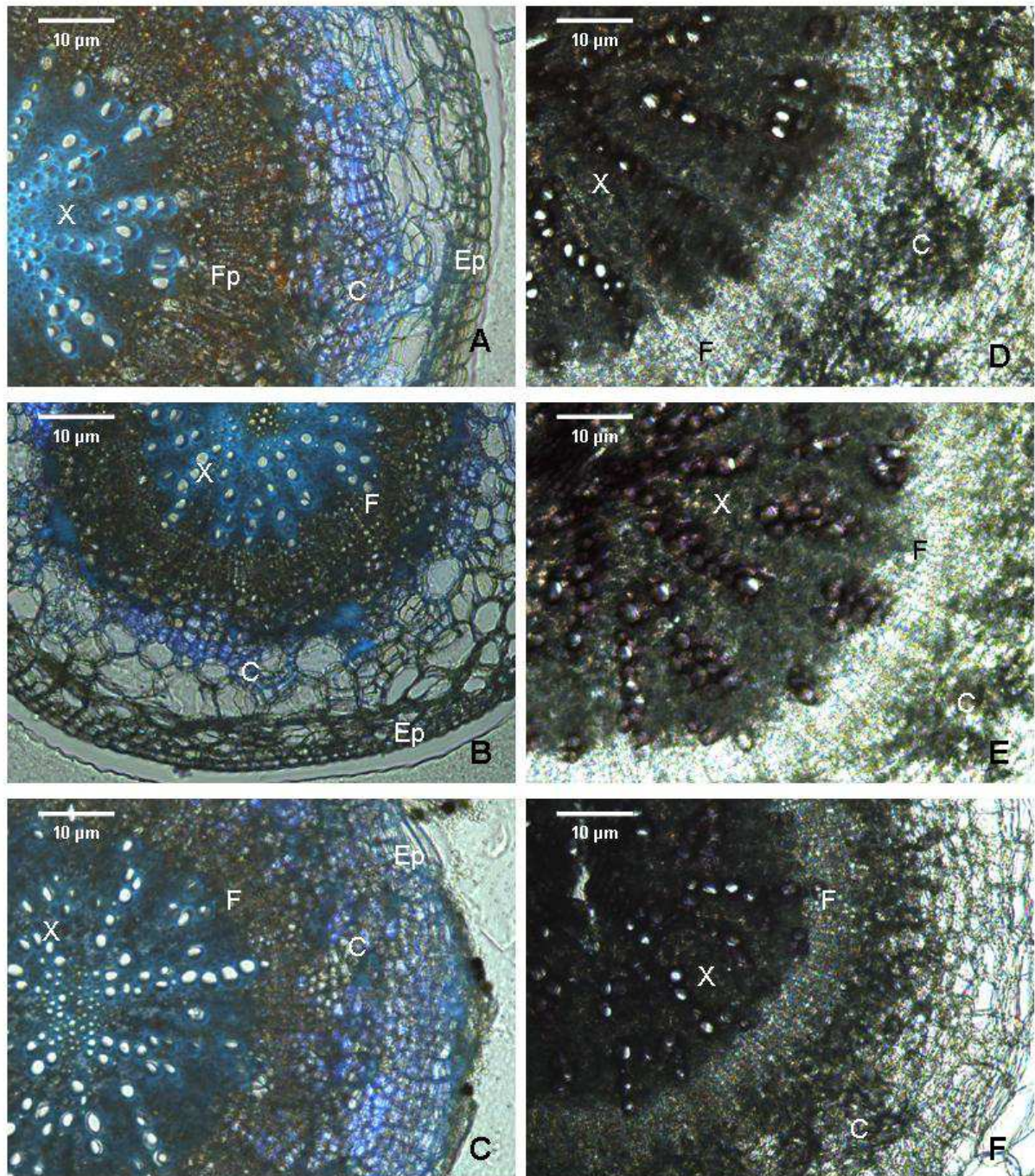
### **Histología del tallo**

La Figura 9 muestra cortes transversales de tallo muestreados según se indica en la Figura 4 para plantas control (A y D) y deficientes en Fe tratadas sin (B y E) o con  $\text{CaCO}_3$  (C y F). Los paneles A-C muestran imágenes de auto-fluorescencia y los paneles D-F muestran la tinción con floroglucinol. En cuanto estas últimas, teñidas con floroglucinol, cabe señalar que el grosor de los cortes no permitió aislar una sola capa de células, por lo que las imágenes tienen poca definición.

Las imágenes de autofluorescencia de las plantas control (Figura 9, A) muestran autofluorescencia azul principalmente en los vasos xilemáticos claramente corroborada por la tinción de floroglucinol (Figura 9, D). Aunque la zona del córtex también mostró cierta coloración azul, ésta resulta difusa probablemente debido a la rotura de la estructura de esta zona del tejido. Igualmente el floroglucinol tiñó el córtex de manera difusa.

A diferencia de lo observado en la raíz, la deficiencia de Fe no causa cambios en la autofluorescencia azul en tallo (Figura 9, A versus B y C) independientemente de la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el medio. Estos resultados fueron confirmados con la tinción de floroglucinol especialmente en cuanto a los vasos xilemáticos (Figura 9, D versus E y F). Este hecho puede atribuirse a que este tejido se desarrolló durante el periodo de pretratamiento. En este periodo todas las plantas crecieron en condiciones de suficiencia de Fe ( $45 \mu\text{M}$  de Fe-EDTA).





**Figura 9.** Cortes de tallo de *Medicago truncatula* observados a 10X. Imágenes de autofluorescencia (A-C) y de tinción con floroglucinol (D-F) de las plantas con tratamientos: control (A y D), deficiente en Fe (B y E) y deficiente en Fe con  $\text{CaCO}_3$  en el medio (C y F). X: xilema; F: Floema; C: córtex; Ep: epidermis. Los cortes se realizaron con el vibratomo a 60  $\mu\text{m}$ .



### **Histología del peciolo**

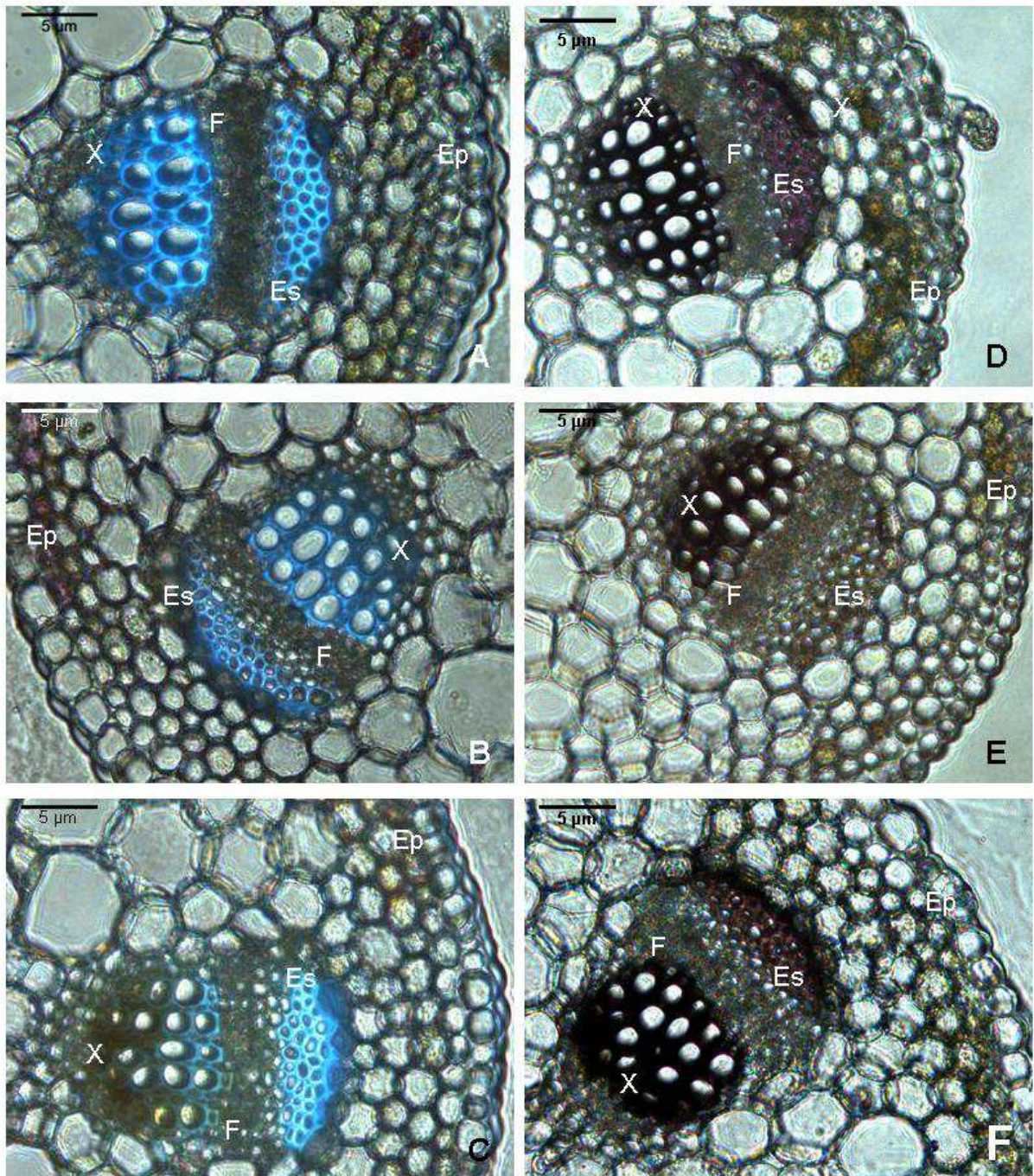
La Figura 10 muestra cortes transversales de peciolo muestreados según se indica en la Figura 4 para las plantas control (A y D) y deficientes en Fe tratadas sin (B y E) o con  $\text{CaCO}_3$  (C y F). Los paneles A-C muestran imágenes de auto-fluorescencia y los paneles D-F muestran la tinción con floroglucinol.

Los peciolos de las plantas control mostraron auto-fluorescencia de color azul intenso principalmente localizada en los vasos xilemáticos y en el esclerénquima, indicándonos las zonas de deposición de la lignina (Figura 10, A). Aunque la tinción con floroglucinol (Figura 10, D) dio positivo en las mismas zonas que la imagen de auto-fluorescencia, el xilema mostró una tinción mayor (coloración Burdeos intensa) que el esclerénquima (Figura 10, D).

La deficiencia de Fe causa cambios en la auto-fluorescencia azul (Figura 10, A versus B y C) y en la tinción con floroglucinol (Figura 10, D versus E y F) de los peciolos nuevos ya crecidos éstas condiciones. Sin embargo, este efecto de la deficiencia sobre la lignificación del peciolo estuvo afectado por la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el medio especialmente en la zona del esclerénquima. Así, los peciolos de las plantas deficientes en Fe y no tratadas con  $\text{CaCO}_3$  (Figura 10, B), mostraron una auto-fluorescencia azul menos intensa tanto en el xilema como en las células del esclerénquima cuando se comparan con las plantas control. La tinción con floroglucinol confirma la acusada disminución de la lignificación del esclerénquima presentada por esta plantas ('-Fe -  $\text{CaCO}_3$ '), ya que no dio positivo para esta zona del tejido (Figura 10, E). Por el contrario, el xilema de estas plantas mostró una intensa tinción con floroglucinol que no difiere de las plantas control (Figura 10, E versus D).

La presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el medio intensificó la disminución de la auto-fluorescencia azul de los vasos xilemáticos producida por la deficiencia de Fe, de manera que la parte más interna de este tejido no presenta auto-fluorescencia azul y aparece de una coloración verdosa (Figura 10, C). Sin embargo, dado que la tinción con floroglucinol fue fuertemente positiva en toda esta zona (Figura 10, F), lo que indica la presencia de lignina, se puede inferir un cambio de composición de la lignina que afecta a la proporción de los grupos fluoróforos responsables de la auto-fluorescencia azul. En cuanto a la auto-fluorescencia azul de la zona del esclerénquima, la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el medio (Figura 10, C) causa un efecto contrario al observado en las plantas deficientes en Fe que no fueron tratadas  $\text{CaCO}_3$  (Figura 10, B), ya que los peciolos de las plantas '-Fe +  $\text{CaCO}_3$ ' mostraron una intensa auto-fluorescencia azul que fue incluso mayor que la de las plantas control

(Figura 10, A). Esto fue completamente confirmado por la tinción con floroglucinol que fue la más intensa de las obtenidas para esta zona (Figura 10, F versus D y E).



**Figura 10.** Cortes de peciolo de *Medicago truncatula* observados a 20X. Imágenes de autofluorescencia (A-C) y de tinción con floroglucinol (D-F) de las plantas con tratamientos: control (A y D), deficiente en Fe (B y E) y deficiente en Fe con  $\text{CaCO}_3$  en el medio (C y F). X: xilema; F: Floema; Es: Esclerenquima; Ep: epidermis. Los cortes se realizaron con el vibratomo a 60 µm.

## 5. Discusión

El estado de desarrollo de las plantas de *Medicago truncatula* concuerdan con lo descrito anteriormente en estudios de deficiencia de Fe en esta especie (Andaluz et al. 2009; Rodríguez-Celma et al. 2011a, 2011b, y Rodríguez-Celma et al. en preparación) dónde se describe el efecto de la deficiencia de este elemento sobre enzimas claves en la adquisición de Fe por la raíz (Andaluz et al. 2009; Rodríguez-Celma et al. 2011a) así como sobre el proteoma de raíz, tallo y peciolo (Rodríguez-Celma et al. 2011b y Rodríguez-Celma et al. en preparación). En todos estos estudios, la deficiencia de Fe causó una severa clorosis en las zonas más jóvenes de la parte aérea, además de una alteración de la morfología de la raíz.

Los resultados presentados en este trabajo señalan que la deficiencia de Fe también afecta a la lignificación de raíces secundarias y peciolos jóvenes. Los haces vasculares, concretamente el xilema, además del esclerénquima y la banda de Caspari fueron los tejidos más afectados. Además, la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el medio cambió el patrón de deposición de la lignina en plantas deficientes en Fe. Así, una menor lignificación en plantas deficientes en Fe no tratadas con  $\text{CaCO}_3$ , fue observada a nivel de partes jóvenes tanto de raíz como de peciolo, quedando excluido de estos cambios el tallo, ya que se formó durante el periodo en el cual la planta no estaba deficiente en Fe. Sin embargo, cuando la deficiencia de Fe es acompañada de  $\text{CaCO}_3$ , el efecto sobre la lignina se reduce al peciolo encontrándose un aumento de lignina tanto en el xilema como en el esclerénquima. Este hecho está de acuerdo con el incremento de aproximadamente 5 veces de dos proteínas (CAD y CCoA-OMT) directamente involucradas en la formación de lignina (ver Figura 1) observado en peciolos jóvenes de *Medicago truncatula* exclusivamente cuando se crecen en deficiencia de Fe con aporte de  $\text{CaCO}_3$  (Rodríguez-Celma et al., 201x).

La disminución de lignina en plantas con clorosis férrica y, por tanto, con una baja actividad fotosintética, concuerda con el hecho de que un estado óptimo de fotosíntesis es crucial para el funcionamiento de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, de la cual procede la formación de lignina (Vogt, 2010). Sin embargo, esto contrasta con el incremento de la lignificación observado en las plantas '-Fe +  $\text{CaCO}_3$ '. Este aumento de lignina y su localización en tejidos adyacentes a los haces vasculares, podría deberse a un mecanismo de protección frente al posible efecto tóxico de altas concentraciones de

Ca, ya que este mecanismo ha sido descrito para elementos tóxicos como el Cd en *Arabidopsis* y *Brassicas* (Lux et al. 2011; Redjala et al. 2011; Nasser et al. 2012). Estos estudios proponen un incremento de la lignificación de los tejidos adyacentes a los vasos, para restringir el paso y distribución de estos elementos a las distintas partes de los órganos a nivel tisular. Cabe destacar que el incremento de la lignificación, especialmente del xilema, fue acompañado de cambios en la auto-fluorescencia que sugieren cambios en la composición de la lignina. Así, una deficiencia energética como la que ocurre en las plantas cloróticas podría aumentar la formación de la lignina tipo H en detrimento de la lignina de tipo G y S, ya que éstas últimas requieren más gasto energético para la planta (Chapple et al., 1992). Esto tendría efectos en la auto-fluorescencia observada, ya que recientemente se ha descrito que la lignina tipo G autofluoresce en un azul más intenso mientras que la lignina tipo H lo hace cercano al verde (Djkonovic et al. 2012). Nuestros resultados nos llevan a proponer que la auto-fluorescencia verdosa observada en el xilema de peciolo de plantas deficientes en Fe tratadas con CaCO<sub>3</sub>, podría ser debida a la deposición preferencial en este tejido de lignina tipo H.

## 6. Adecuación de las técnicas de microscopía para la tinción de lignina en tejidos de *M. truncatula*

Al comienzo de este estudio se planteó el uso de auto-fluorescencia y las tinciones de safranina, floroglucinol y Johansen con el objetivo de evaluar cuales eran las más adecuadas para estudiar las posibles variaciones en la lignificación inducidas por la deficiencia de Fe en *Medicago truncatula*. Las imágenes tomadas mediante safranina y Johansen (Imágenes 12 y 14 del Anexo I), no resultaron adecuadas por los siguientes motivos:

- En esta especie, la tinción con safranina no fue específica para la lignina ya que tiñó toda la pared celular. Esto no permitió diferenciar la celulosa de la lignina y, por lo tanto, no se apreciaron diferencias entre tratamientos (Figura 13 del Anexo I).
- La tinción de Johansen permitió una buena visualización de los tejidos lignificados (Figura 15 del Anexo I). Sin embargo, esta técnica se podría mejorar para *Medicago truncatula* mediante una optimización de la fase de lavado con el fin de mantener la diferenciación entre los colorantes (Figura 15, E y F).

Por otro lado, la auto-fluorescencia y la tinción con floroglucinol, aunque dieron buenos resultados (Figuras 8-10), son susceptibles a cambios para incrementar su eficiencia resolutive. A continuación, presentaremos algunas de las propuestas para la mejora de estas técnicas:

- Las imágenes de auto-fluorescencia de raíz mostraron interferencias derivadas de la presencia de flavinas que también fluorescen (Figura 8, B y C). Una posible solución a estas interferencias sería el tratamiento de los cortes con un compuesto de contraste como puede ser el Azul de Toluidina, disminuyendo la señal de autofluorescencia emitida por los tejidos. Posteriormente, debería ser teñido con un colorante exaltador como el Fluorol Yellow en el caso del estudio de la lignina.
- La calidad de las imágenes de la tinción con floroglucinol podría mejorarse mediante una disminución en el grosor de los cortes y para ello se propone el uso de fijadores (p. ejemplo, paraformaldehído) junto a un cambio de inclusión a parafina. Esta mejora proporcionaría un endurecimiento de los tejidos y una



matriz que mantiene su estructura en el momento del corte, pudiéndose realizar cortes más finos sin un desgarramiento y/o rotura de las distintas capas de células.

## 7. Conclusiones

1. La tinción con floroglucinol y la auto-fluorescencia resultan generalmente adecuadas para evaluar los cambios en la lignificación inducidos por deficiencia de Fe en plantas de *Medicago truncatula*.
2. La deficiencia de Fe induce una menor lignificación de las zonas en crecimiento como raíces secundarias y peciolo en *Medicago truncatula*.
3. La deficiencia de Fe en presencia de  $\text{CaCO}_3$  produce un incremento en la lignificación de las paredes celulares tanto a nivel del xilema como del esclerénquima en peciolo jóvenes de *Medicago truncatula*.

## 8. Bibliografía

- Abadía, J., y Abadía, A. (1993). Iron and plant pigments. In Iron chelation in plants and soil microorganisms L.L. Barton, y B.C. Hemming, eds. (San Diego: Academic), pp. 327- 343.
- Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez- Fernández, A., y López-Millán, A.F. (2011). Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol Biochem* 49, 471-482.
- Aitken, Y. (1955). Flower initiation in pasture legumes. III. Flower initiation in *Medicago tribuloides* Desr. and other annual medics. *Aust J Agric Res* 6, 258-264.
- Alcántara, E., de la Guardia, M.D. y Romera, F. J. (1991). Plasmalemma redox activity and H<sup>+</sup> extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiol* 96, 1034-1037.
- Andaluz, S., Rodríguez-Celma, J., Abadía, A., Abadía, J., y López-Millán, A.F. (2009). Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiol Biochem* 47, 1082-1088.
- Barker, V.A. y Pibeam, D.J. (2006). *Plant Nutrition* 6<sup>a</sup> edition. Barker A. y Pibeam D.J.(eds). 3-18
- Bell, P.F., Chaney, R.L. y Angle, J.S. (1988). Staining localization of ferric reduction on roots. *J Plant Nutr* 11, 1237-1252.
- Briat, J.F. y Lobréaux, S. (1997). Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* 2, 187-193.
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R. y Weisskopf, L. (2010). Release of plantborne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition, *Plant Soil* 329, 1-25
- Chaney, R.L. (1984). Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants. *J Plant Nutr* 7, 47-67.
- Chapple, C. C. S., Vogt, T., Ellis, B. E. y Somerville C.R. (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell* a, 1413-1424.
- Chen, Y. y Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv Agron* 35, 217-240.
- Clark, R.B. (1983). Plant genotype differences in the uptake, translocation, acumulation and use of mineral elements required for plant growth. *Plant and Soil* 72, 175-196
- Djikanovic, D., Simonovic, J., Savic, A. Ristic, I., Bajuk-Bogdanovic, D. Kalazi, A. Cakic, S. Budijski-Smendic, J. Milonad, J. y Ksenija R. (2012). Structural differences between lipin model polymers. *J. Poly Enurom* (2012) in press.
- Donnini, S. Dell'Orto, M y Zocchi, G. Oxidative stress response and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotypes. *Three Physiology* 31, 102-113.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., y Guerinot, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5624-5628.
- Espen, L., Dell'Orto, M., De Nisi, P. y Zocchi, G. (2000). Metabolic responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under Fe-deficiency: a 31P-nuclear magnetic resonance in-vivo study. *Planta* 210, 985-992.
- Fox, T.C., y Guerinot, M.L. (1998). *Molecular Biology of Cation Transport in Plants*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 669-696.



- Hutchinson, T.C. (1967). Coralloid root systems in plants showing lime-induced chlorosis. *Nature* 214, 943-945.
- Ishimaru, Y., Kim, S., Tsukamoto, T., Oki, H., Kobayashi, T., Watanabe, S., Matsubashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. y Nishizawa, N.K. (2007). Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 7373-7378.
- Jiménez, S., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., Moreno, M.A. y Gogorcena, Y. (2009). Elemental 2-D mapping and changes in leaf iron and chlorophyll in response to iron re-supply in iron-deficient GF 677 peach-almond hybrid. *Plant Soil* 315, 93-106.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, inc.
- Jones, L. Emmos, A.R. y Tunner, S.R. (2001). Cloning and characterization of irregular xilem 4: o severely lignin deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* 26, 205-216.
- Kashirad, A. y Marschner, H. (1974). Effect of pH and phosphate on iron nutrition of sunflower and corn plants. *Agrochimica* 6, 497-508.
- Lesins, K.A. and Lesins, L. (1979). *Genus Medicago (Leguminosae). A taxogenetic study*. Dr W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London, 228 p.
- Lindsay, W.L., y Schwab, A.P. (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition* 5, 821-840.
- López-Millán A. F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M. y Patton, W.F. (2000). A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21, 3673-3683
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M. y White, P.J. (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* 62: 21-37.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (London: Academic Pres).
- Mengel, K. y Geurtzen, G. (1986). Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis. *J Plant Nutr* 9, 161-173.
- Moog, P.R., van der Kooij, T.A.W., Brüggemann, W., Schiefelbein, J.W. y Kuiper, P.J.C. (1995). Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: The turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* 195, 505-513.
- Morales, F., Abadía, A. y Abadía, J. (1990). Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 94, 607-613.
- Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. (1994). Characteristics of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106, 127-133.
- Morales, F., Grasa, R., Abadía, A. y Abadía, J. (1998). Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition* 21, 815-825.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C. y Geldner, N. (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(25):10101-6.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H. y Nishizawa, N.K. (2011). Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem* 286, 5446-5454.

- Ojeda-Barrios, D., Abadía, J., Lombardini, L., Abadía, A., y Vázquez, S. (2011) Zinc deficiency in field-grown pecan trees: changes in leaf nutrient concentrations and structure. *wileyonlinelibrary.com*. DOI 10.1002/jsfa.5530
- Pedas, P., Ytting, C.K., Fuglsang, A.T., Jahn, T.P., Schjørring, J.K. y Husted, S. (2008). Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiology*, vol 148, no. 1, pp. 455-466.
- Pinton, R., Cesco, S., de Nobili, M., Santi, S. y Varanini, Z. (1998). Water and pyrophosphate extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biol Fert Soils* 26, 23-27.
- Redjala, T., Zelko, I., Sterkeman, T., Legue, E. V., Lux, A. 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* 71: 241-248
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., y Guerinot, M.L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694-697.
- Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Grusak MA, Abadía A, Abadía J y López-Millán AF (2011a) Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J Proteom Res* 10:2590-2601.
- Rodríguez-Celma, J., Vázquez-Reina, S., Orduna, J., Abadía, A., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., y López-Millán, A.F. (2011b). Characterization of flavins in roots of Fe-deficient Strategy I plants, with *Medicago truncatula* on the focus. *Plant Cell Physiology*, In press.
- Römheld, V. (2000). The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *J Plant Nutr* 23, 1629-1643.
- Römheld, V. y Marschner, H. (1981). Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower. *Physiol Plant* 53, 354-360.
- Ruzin, E. (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: Oxford University Press.
- Sanz, M., Cavero, J. y Abadía, J. (1992). Iron chlorosis in the Ebro river basin, Spain. *Journal of Plant Nutrition* 15, 1971-1981.
- Santi, S., y Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 183, 1072-1084.
- Schmidt, W. y Schuck, C. (1996). Pyridine nucleotide pool size changes in iron-deficient *Plantago lanceolata* roots during reduction of external oxidants. *Physiol Plant* 98, 215- 221.
- Sijmons, P.C. y Bienfait, H.F. (1984). Mechanism of iron reduction by roots of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Nutr* 7, 687-693.
- Sijmons, P.C., Lanfermeijer, F.C., De Boer, A.H., Prins, H.B.A. y Bienfait, H.F. (1984). Depolarization of cell membrane potential during trans-plasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76, 943-946.
- Tagliavini, M., Abadía, J., Rombolá, A.D., Abadía, A., Tsipouridis, C. y Marangoni, B. (2000). Agronomic means for the control of iron chlorosis in deciduous fruit plants. *J. Plant Nutr* 23, 2007-2023.
- Terry, N. y Abadía, J. (1986) Function of iron in chloroplast. *J Plant Nutr* 9, 609-646.
- Tomasi, N., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P., Vigani, G., Maffi, D., y Zocchi, G. (2009). Iron availability affects the function of mitochondria in cucumber roots. *New Phytol* 182, 127-136.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. Vol 3, 1, pp 2-20.

Wei, L., Loeppert, R. y Ocumpaugh, W. (1997) Fe-Deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subterranean clover - importance of induced H<sup>+</sup> release. *J Exp Bot* 48, 239-246.

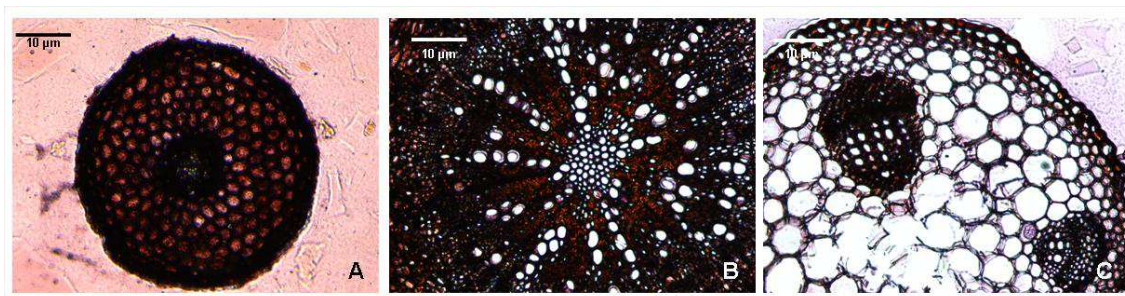
Welkie, G.W. y Miller, G.W. (1993). Plant iron uptake physiology by nonsiderophore systems. In *Iron Chelation in Plants and Soil microorganisms*, Eds L Barton and B Hemming. pp 345-369.

Young, T.F. y Terry, N. (1982). Transport of iron into leaves following iron resupply to iron stressed sugar beet plants. *J Plant Nutr* 5, 1273-1283.

.

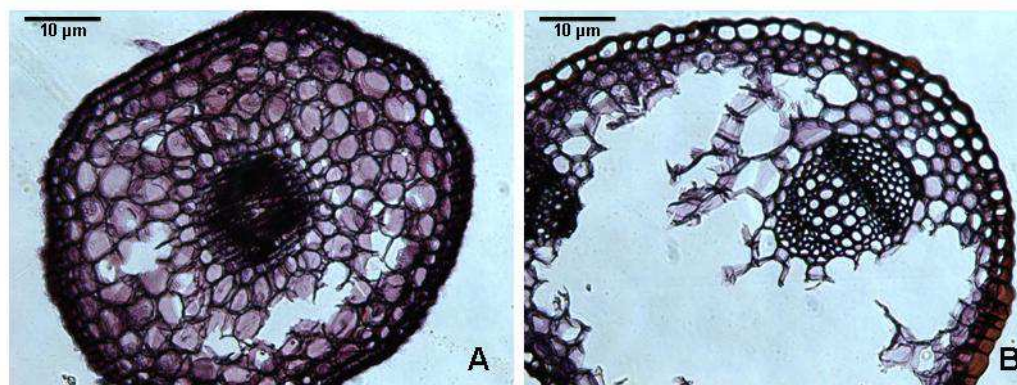
## Anexo I

### Imágenes tomadas con tinción con safranina



**Figura 11.** Ejemplo de cortes en fresco de raíz (A) a 80  $\mu\text{m}$ , tallo (B) a 100  $\mu\text{m}$  y peciolo (C) a 60  $\mu\text{m}$ , todos pertenecientes a una planta deficiente en Fe con  $\text{CaCO}_3$  teñidos con safranina. Aumentos 10x.

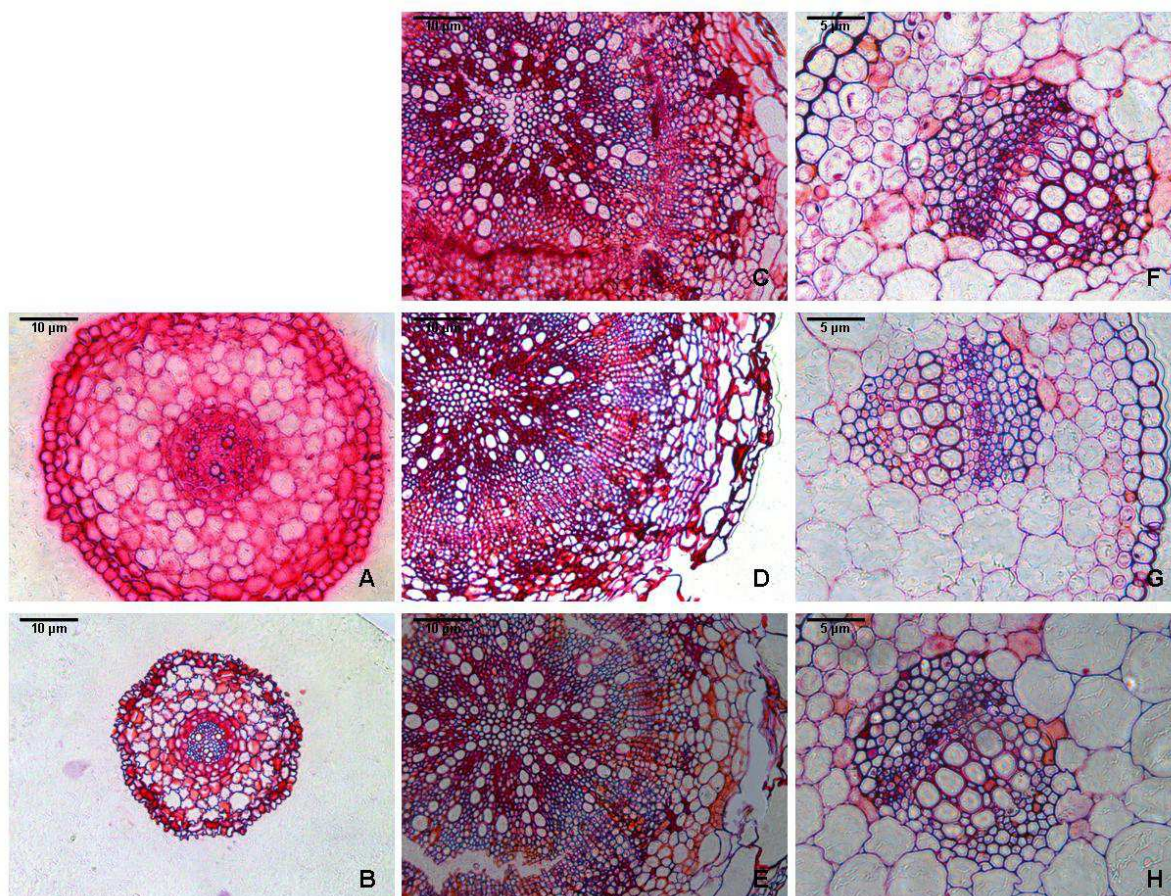
**Comentario de la Figura 11:** en estos paneles se observa que el espesor de los cortes hechos en fresco con el vibratomo impide visualizar con claridad los tejidos, a pesar de haber sido previamente coloreados.



**Figura 12.** Ejemplos de cortes de raíz (A) y peciolo (B) deficientes en Fe cortados en fresco con el vibratomo a 40  $\mu\text{m}$  de espesor y teñidos con safranina. 10x aumentos.

**Comentario de la Figura 12:** En esta imagen se aprecia como, al disminuir el espesor de los cortes, se produce la rotura de las células.

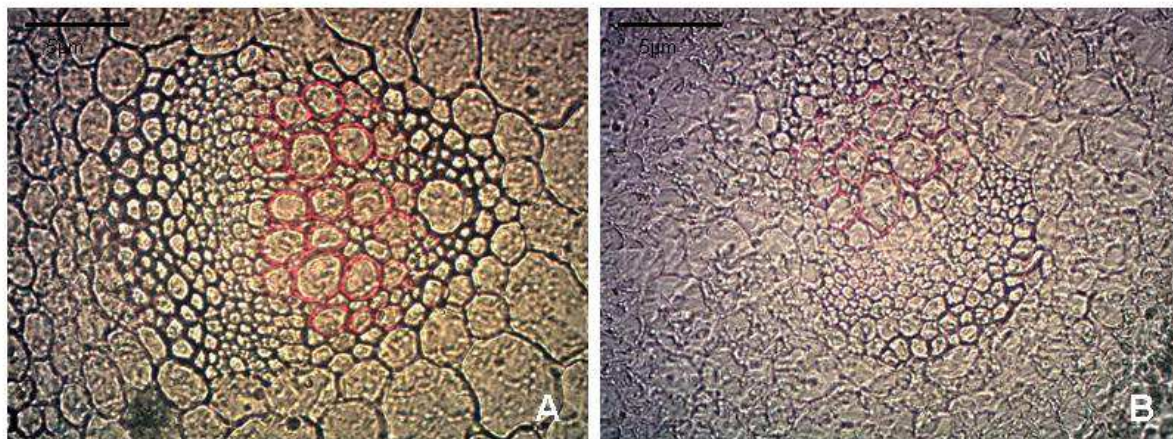




**Figura 13.** Micrografías de raíz (A y B), tallo (C, D y E) y peciolo (F, G y H) en tratamiento control (C y F), deficiente en Fe (A, D y G) y deficiente con  $\text{CaCO}_3$  (B, E y H) teñidos con safranina. A, B y C corresponden a una ampliación 20x, D, E, F, G y H a una ampliación 10x. Los cortes se realizaron con el microtomo a 20  $\mu\text{m}$ .

**Comentario Figura 13:** aunque no hubo problemas técnicos a la hora de realizar estos cortes, las imágenes resultantes no fueron representativas de los cambios producidos en los tejidos con los distintos tratamientos.

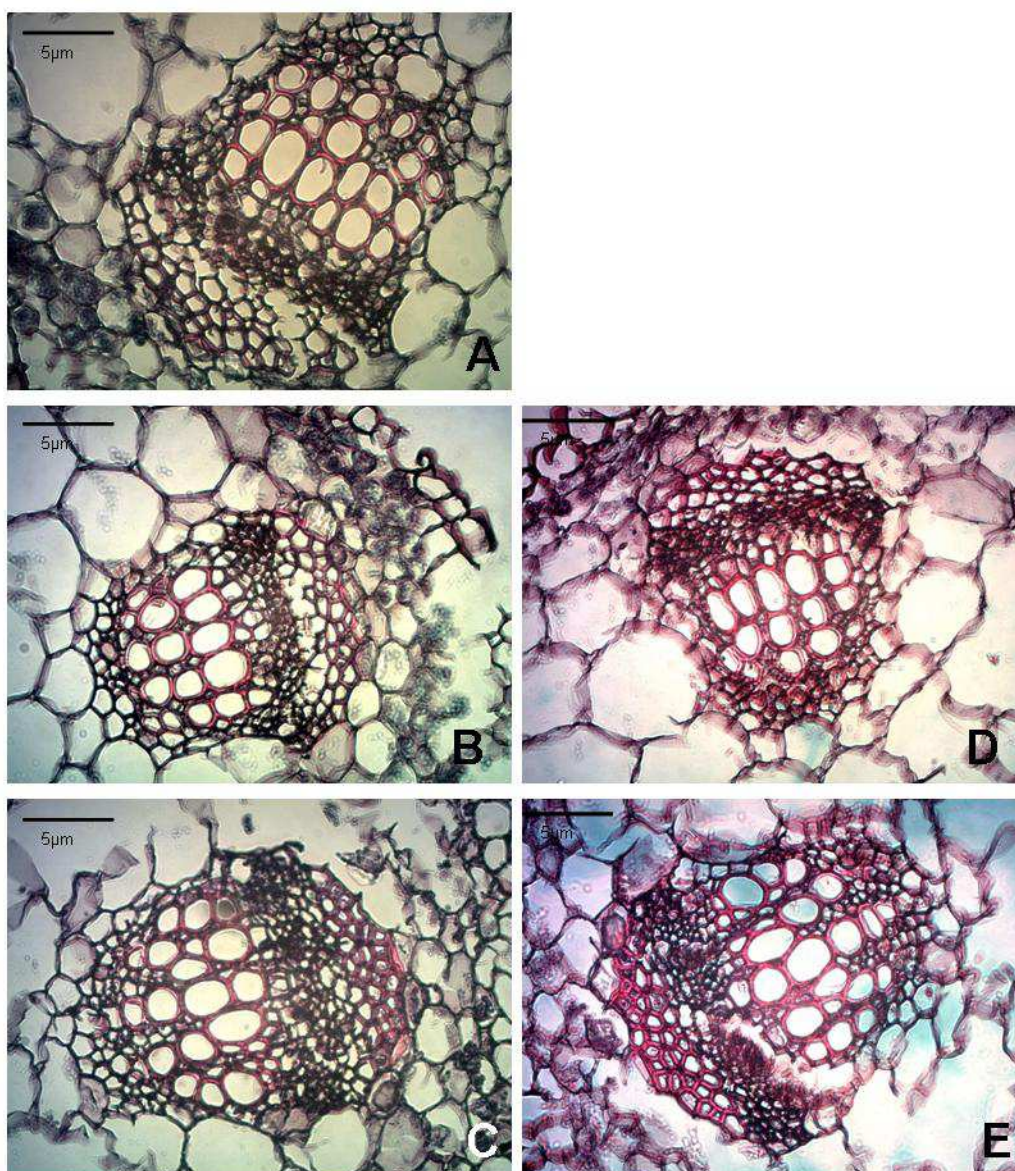
**Imágenes tomadas con tinción de floroglucinol**



**Figura 14.** Ejemplo de micrografías tomadas con tinción de floroglucinol e inclusión en resina de peciolo de plantas cultivadas en condiciones control (A) y – Fe (B). 40 x aumentos. Los cortes se realizaron con el microtomo a 20 µm.

**Comentario de la Figura 14:** En este caso se realizó una tinción con floroglucinol sobre cortes incluidos en resina observándose que ésta crea una matriz granulosa que impide la correcta visualización de las imágenes.



**Imágenes tomadas con tinción de Johansen**

**Figura 15.** Micrografías de peciolo en tratamiento control (A), deficiente en Fe (B y D) y deficiente con carbonato (C y E) teñidas con la técnica de Johansen incluidas en parafina.

40x aumentos. Los cortes se realizaron con el microtomo a 30 µm.

**Comentario de la Figura 15:** Los paneles A, B y C, pertenecen a una misma prueba, en la que puede verse la rotura de los tejidos, probablemente debido a fallos en el proceso de inclusión en parafina.

Los paneles D y E, corresponden a otra prueba en la que no hubo efecto del Fast green sobre los tejidos, por lo que éstos únicamente presentan la coloración roja de la safranina, probablemente debido a una mala diferenciación. Además, estos cortes fueron adheridos al

porta con huevina, que adquirió coloración con el Fast-green provocando la aparición de manchas de fondo en las imágenes.

Como se comenta en el apartado de metodología, a pesar de que hasta el momento de la elaboración de este trabajo no se obtuvieron buenos resultados, la técnica parece ser prometedora, y se seguirá trabajando con ella en un futuro.



