

Ensayos

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en el metabolismo central de los vegetales

Resumen

Para entender la fisiología de las plantas en la respuesta a factores estresantes y en su desarrollo, es necesario conocer el funcionamiento de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), porque esta presente en todo su desarrollo. En plantas superiores existen tres isoenzimas asociadas a diferentes funciones fisiológicas, en plantas C_3 , C_4 y CAM. PEPC se localiza en células de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de las plantas C_4 , en tejidos no fotosintéticos de plantas C_3 , en frutos y semillas. Se ha reportado actividad de la PEPC en el desarrollo, maduración y germinación de semillas, en maduración de frutos, en estabilización y regulación del pH en las células guarda de los estomas y en la regulación del pH celular. Las actividad de PEPC ayuda a dimensionar su importancia en el metabolismo de los vegetales, con énfasis en las especies que tienen interés económico, por las ventajas que tiene: a) Incide directamente en el incremento de la productividad por medio de la fotosíntesis en algunas especies vegetales como las plantas C_4 , b) Adaptación a condiciones adversas de estrés hídrico, como lo puede producir la sequía o las altas concentraciones de salinidad y c) en la estimulación y desarrollo de semillas y frutos.

Abstract

To understand the physiology of plants in responses to stress and its development one has to know how the phosphoenolpyruvate carboxylase enzyme (PEPC) functions since it is present throughout its development. In higher plants, there are three isoenzymes associated with different physiological functions in C_3 , C_4 and CAM plants. PEPC is present in photosynthetic and non-photosynthetic C_4 cell plants, in non-photosynthetic tissues of C_3 plants, and in fruits and seeds. PEPC activity has been reported in the development, ripening and germination of seeds, in the ripening of fruits, in stabilizing and regulating pH in the guard cells of stomatal pores, and in regulating cellular pH. The functions of the PEPC help us to determine its importance in plant metabolism, with emphasis on species that are of economic interest. PEPC has several advantages: a) It induces an increase in production through photosynthesis in some vegetable species such as C_4 plants, b) it adapts to adverse conditions of osmotic stress produced by drought or high concentrations of salinity and c) it stimulates the development of seeds and fruits.

Resumé

Pour comprendre la physiologie des plantes en réponse aux facteurs de stress et au sein de leur croissance, il est nécessaire de connaître le fonctionnement de l'enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), car celle-ci est présente durant tout leur développement.

Chez les plantes supérieures, il existe 3 iso-enzymes associées à différentes fonctions physiologiques, aussi bien pour les plantes C_3 , C_4 que pour les plantes CAM. La PEPC se trouve dans les cellules des tissus photosynthétiques et non photosynthétiques des plantes C_4 , dans les tissus photosynthétiques des plantes C_3 , dans les fruits et les graines. On a reporté l'activité de PEPC dans la formation, la maturation et la germination des graines, la maturation des fruits, la stabilisation et régulation du pH dans les cellules de garde des stomates ainsi que dans la régulation du pH cellulaire.

Les activités de PEPC aident à mesurer son importance dans le métabolisme des végétaux, surtout pour les espèces qui ont un intérêt économique, et ce du fait que l'enzyme a divers avantages, elle agit directement sur : a) l'augmentation de la productivité par le biais de la photosynthèse chez quelques espèces végétales comme les plantes C_4 , b) l'adaptation à des conditions difficiles de stress hydrique, comme la sécheresse ou les hautes concentrations de salinité, c) la stimulation et le développement des graines et des fruits.

Roberto López Pozos, José Luis
Arcos García, Abelardo Bernabé
Hernández

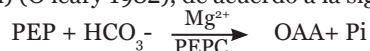
Palabras clave: Estrés, fisiología, metabolismo, plantas, productividad

Introducción

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) esta ampliamente distribuida en células vegetales, bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas (Matsumura *et al.* 1999), cianobacterias y en algas verdes (Chollet *et al.* 1996, O'leary 1982) Participa en procesos de la ruta fotosintética en la fijación del CO_2 atmosférico en plantas C_4 (Hatch, 1978) y en las plantas con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (Ting 1985); también es la enzima anaplerótica más importante de todos los tejidos vegetales (Latzko 1983; O'leary 1982), que suministra ácidos dicarboxílicos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Matsumura *et al.* 1999) cuando son utilizados intermediarios para biosíntesis.

Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Ciudad Universitaria. Puerto Escondido Mixtepec, Juquila, Oaxaca.

La enzima PEPC cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP), reacción altamente exergónica con un cambio de energía muy negativo ($\Delta G^0 = -6$ a -8 Kcal/mol) que es prácticamente irreversible bajo condiciones celulares, utiliza bicarbonato como sustrato y Mg^{2+} , produce oxaloacetato (OAA) y fosfato inorgánico (Pi) (O'leary 1982), de acuerdo a la siguiente reacción:



Se han descrito tres isoenzimas de PEPC en plantas superiores asociadas a diferentes funciones fisiológicas: 1) la isoenzima fotosintética de la hoja de plantas C_4 , que cataliza la fijación de CO_2 en la primera reacción de la ruta C_4 (O'leary 1982), 2) la isoenzima de las plantas CAM, con función fotosintética presente en plantas de clima desértico, en donde la fijación de CO_2 ocurre durante la noche (Hatch 1978; Hatch 1987; Hatch y Osmond 1976) y 3) la isoenzima anaplerótica, que desempeña un papel importante en el abastecimiento de compuestos de cuatro carbonos al Ciclo de Krebs, cuando los intermediarios de este ciclo están siendo usados para biosíntesis (Andreo *et al.* 1987; O'leary 1982). Estas isoformas están codificadas por genes diferentes y pueden distinguirse por sus propiedades cinéticas y por su comportamiento cromatográfico (Westhoff y Gowick 2004).

Las plantas C_4 tienen la isoforma de PEPC con función fotosintética. Estas plantas se caracterizan por presentar dos tipos de células diferenciadas que participan

en el metabolismo fotosintético de la hoja (Hatch y Osmond 1976; Welkie y Coldwell 1970).

En la Figura 1 se muestra un esquema simplificado de metabolismo C_4 , donde las células del mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman CO_2 directamente de la atmósfera, se hidrata a bicarbonato en el citosol por la enzima anhidrasa carbónica (CA) y, subsecuentemente lo asimila en forma de OAA, un ácido de cuatro carbonos, mediante PEPC (Hatch 1978). Este metabolito se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la enzima málico deshidrogenasa (MDH) dependiente de $NADP^+$ ($NADP$ -MDH). El malato, en intercambio con el OAA que se está produciendo, es transportado al citoplasma, para posteriormente, ser llevado a las células de la vaina vascular, las cuales se localizan en la periferia de las haces vasculares en donde están aisladas del intercambio directo de CO_2 con la atmósfera. En las células de la vaina vascular, el malato es descarboxilado mediante la enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de $NADP^+$ (enzima málica- $NADP$) y el CO_2 producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos mediante el Ciclo de Calvin que tiene lugar en estas células. El piruvato, producto de la descarboxilación regresa a las células del mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde produce PEP en una reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK). La función principal de la

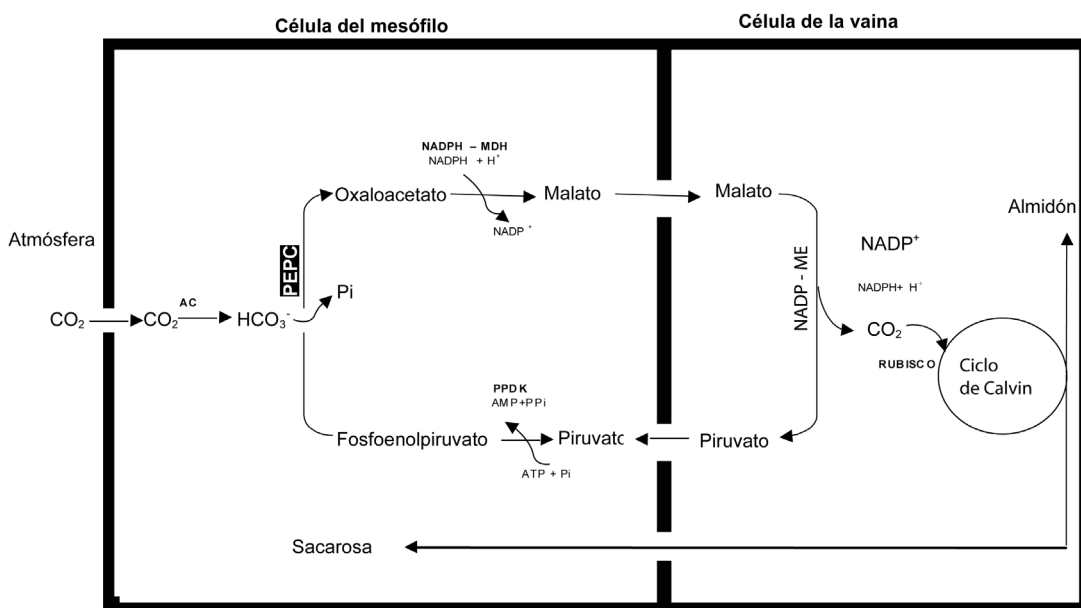


FIGURA 1. CICLO DE LA RUTA C_4 DE LA FOTOSÍNTESIS EN MAÍZ. AC, ANHIDRASA CARBÓNICA; $NADPH$ -MDH, $NADP$ -MALATO DESHIDROGENASA; $NADP$ -ME, ENZIMA MÁLICA; RUBISCO, RIBULOSA DIFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA; PPDK, PIRUVATO ORTOFOSFATO DICINASA

ruta C_4 es concentrar CO_2 en las células internas de la vaina vascular por medio de la PEPC que funciona como una bomba, enviándolo a donde se encuentra la enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), para así suprimir su actividad de oxigenasa y la fotorrespiración asociada (Edwards y Huber 1981).

El sistema fotosintético C_4 opera con pérdidas de agua menores que la fotosíntesis C_3 , por que la afinidad por CO_2 es superior en las C_4 y pueden mantener alta velocidad de fijación con apertura estomatal limitada, que permite fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con baja concentración de CO_2 ; intercambian CO_2 por agua más eficientemente que las plantas C_3 , porque la concentración interna de CO_2 es mucho más baja que en estas últimas. Por otra parte, la asimilación de CO_2 es más eficiente en las plantas C_4 , porque poseen la capacidad de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa y crecen mejor en condiciones de alta intensidad lumínica (Edwards y Huber 1981), por esa razón las plantas C_4 dominan la flora de los pastizales y la producción de biomasa en regiones de clima tropical y subtropical (Westhoff y Gowick 2004).

En las plantas CAM, la fijación del CO_2 ocurre en forma similar a las C_4 ; sin embargo, la actividad de las enzimas carboxilantes, Rubisco y PEPC están separadas en el tiempo y no en el espacio como acontece en las plantas C_4 . Las enzimas involucradas en la fotosíntesis se encuentran en una misma célula y su actividad se expresa de forma diferente a lo largo del día. En estas plantas durante la noche cuando la enzima PEPC está activa, los estomas se encuentran abiertos, el CO_2 es fijado produciendo OAA a partir de PEP. El OAA se transforma en malato que se almacena en vacuolas hasta el día siguiente (Ting 1985). En las primeras horas de la mañana, la fijación del CO_2 la llevan a cabo conjuntamente la PEPC y Rubisco, pero al aumentar la temperatura e intensidad de luz, los estomas se cierran para evitar la pérdida excesiva de agua, es entonces cuando el malato es movilizado desde las vacuolas y la actividad de PEPC disminuye y está en presencia de su inhibidor. La descarboxilación del malato crea una concentración elevada de CO_2 , el cual es utilizado por la Rubisco en la misma forma que lo hacen los cloroplastos de las hojas de plantas C_3 (Ting 1985).

Las isoformas de PEPC con funciones no fotosintéticas, se encuentran en células de los tejidos no fotosintéticos de las plantas C_4 (O'leary 1982), en los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas C_3 (Vance *et*

al. 1994), en semillas (Leblona *et al.* 1991) y en frutos (Law 1995), donde funciona como enzima anaplerótica, que reabastece al ciclo de los ácidos tricarboxílicos de OAA, cuando sus intermediarios son empleados para síntesis de aminoácidos o porfirinas. Estas isoformas tienen mayor afinidad para el sustrato PEP, la K_m es hasta 10 veces menor que la isoforma fotosintética (Holaday y Black 1981; Ting y Osmond 1973), mientras que para bicarbonato, el segundo sustrato de la enzima tiene menor afinidad en plantas C_3 que en plantas C_4 (Bauwe 1986).

Algunas de las funciones de PEPC como enzima anaplerótica son las siguientes: la asimilación de nitrógeno en nódulos aumenta por actividad de PEPC, cuando se requiere de esqueletos carbonados para la asimilación inicial de N, estos esqueletos se derivan del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como α -cetoglutarato y oxaloacetato (Shubert 1986). En los nódulos de raíz de las leguminosas, la PEPC proporciona una cantidad sustancial de carbono para rellenar la poza de ácidos orgánicos para la síntesis de malato (Shubert 1986). Se ha determinado que hasta el 25% del carbono requerido para la actividad de nitrogenasa y la asimilación de nitrógeno podría ser aportado por PEPC (King *et al.* 1986). La PEPC puede comprender hasta el 2% del total de la proteína soluble del nódulo en especies que transportan amidas (Miller *et al.* 1989).

La PEPC participa en tejidos con alta actividad metabólica como el tejido vascular de las semillas en formación, en la maduración y su germinación, se ha observado gran cantidad de PEPC durante la diferenciación, también se ha observado alto contenido de PEPC en la aleurona cuando la actividad mitótica en esas células es alta y puede estar relacionada con la acumulación de malato en el endospermo almidonoso, en los últimos estados de desarrollo del grano (González *et al.* 1998). Durante la maduración de las semillas de ricino también se ha observado que hay gran incremento de la actividad de PEPC y probablemente está involucrado en la generación de malato para la síntesis de lípidos de reserva (Sangwuan *et al.* 1992).

Durante la fase temprana de la germinación la PEPC del endospermo, cumple probablemente con una función crítica en desarrollar pozas de ácidos de cuatro carbonos, necesarios para disparar la actividad de los ciclos de Krebs y del glioxilato (Sangwuan *et al.* 1992), subsecuentemente alimentar anapleróticamente de intermediarios del ciclo del ácido cítrico traslocados en el

anabolismo (Podestá *et al.* 1994); en los cotiledones funciones similares pueden ser atribuidas a la PEPC, donde el ARNm de PEPC se acumula transitoriamente en el escutelo y aleurona ya que hay un aumento máximo a las 24 horas después de la imbibición en el trigo (González *et al.* 1998) y sorgo (Khayat *et al.* 1991).

En la maduración de los frutos participa en la regulación del flujo del carbono glucolítico y gluconeogénico. En la maduración del fruto la variación en la concentración de PEP está asociada al inicio de la liberación rápida de CO₂ o respiración climatérica (Beaudry *et al.* 1989), por lo que puede haber una activación de PEPC el inicio al climaterio (Law y Plaxton 1995).

Otras funciones en las que participa la PEPC es en que estabiliza el pH en las células guarda de los estomas, mantiene el balance de cargas al acumularse aniones orgánicos, principalmente malato (Tarczynski y Outlaw 1993). De igual forma regula el pH celular, ya que la síntesis de malato genera iones H⁺ y su degradación produce iones OH⁻ (Martinoia y Rentsch 1994). Participa en el transporte de equivalentes reductores de la mitocondria al citoplasma o del cloroplasto al peroxisoma y contribuye al mantenimiento del balance de cargas en la célula y fluidos de la planta, aumentando la concentración del malato cuando existe un exceso de cationes (Deroche y Carrayol 1988; Martinoia y Rentsch 1994).

Las características generales de la PEPC son las siguientes: La masa molecular de la enzima purificada de plantas C₃, C₄ y CAM en su forma nativa es de aproximadamente 400 kDa, es un homotetrámero, formada por cuatro subunidades idénticas de masa molecular aproximada de 100 kDa (O'leary 1982). Aunque también se han encontrado PEPCs con masa molecular de 240 kDa compuesta de cuatro subunidades de masa molecular aparente de 60 kDa (Sako *et al.* 1996) en *Methanothermobacter sociabilis*.

La secuencia de aminoácidos y los genes de la proteína entre la PEPC de angiospermas C₃, C₄, CAM y gimnospermas tienen un grado de similitud mayor al 80%, (Relle *et al.* 1996), sin embargo, presentan grandes diferencias con la enzima de procariontes (Lepeniec *et al.* 1994).

Para la actividad de PEPC se requiere primero el ion Mg²⁺ (Bandurski 1955), después PEP y finalmente bicarbonato (Chollet *et al.* 1996), se ha determinado por medio de estudios cinéticos en PEPC de hoja de maíz, que el complejo Mg-PEP es el sustrato verdadero de la enzima, ya que la afinidad es mayor que por PEP o Mg²⁺ libres

(Podestá y Plaxton 1994; Tovar-Méndez *et al.* 1988). En hojas de plantas C₃ se desconoce el verdadero sustrato de la reacción, pero se ha reportado que la Km(PEP) es cinco veces menor para las enzimas de plantas C₃ en relación con las C₄ (Holaday y Black 1981; Ting y Osmond 1973). Otros factores que influyen en la cinética de la enzima son la concentración de bicarbonato y el pH, la actividad máxima se observa a pH cercano a 8 (Bandurski 1955; Coombs *et al.* 1973; Relle y Mild 1996).

La PEPC es una enzima sujeta a control alostérico por diversos metabolitos, especialmente a pH aproximado al fisiológico. Sus principales reguladores son: activadores como azúcares fosforilados, glucosa-6-fosfato y triosas fosfato (Coombs *et al.* 1973), aminoácidos neutros como glicina (Nishikido y Takunashi 1973) e inhibidores, como ácidos dicarboxílicos, principalmente malato y aspartato (Andreo *et al.* 1987; Law y Plaxton 1995; Lepeniec *et al.* 1994). La PEPC de plantas C₄ es además activada homotrópicamente por su sustrato MgPEP y heterotrópicamente por PEP libre, que se une al sitio alostérico de azúcares fosforilados (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares 1990; Tovar-Méndez *et al.* 1988).

Una característica de la cinética de PEPC de hoja de maíz, es que se encuentra prácticamente inactiva a concentraciones fisiológicas similar de la PEP, si la concentración de activadores alostéricos es baja (Tovar-Méndez y Mújica-Jiménez 2000) de tal manera, que los cambios de H⁺ en el citosol y los niveles de metabolitos como glucosa-6-fosfato, glicina, alanina, malato y/o aspartato contribuyen a la regulación de la actividad de PEPC *in vivo*.

Las isoformas de PEPC están sujetas a regulación *in vivo* por la fosforilación de una serina en el extremo amino terminal, al fosforilarse aumenta su actividad y modifica su sensibilidad a los efectores alostéricos (Wang y Chollet 1993; Pacquit *et al.* 1993). La fosforilación de PEPC de hoja de plantas C₃ y C₄ es llevada a cabo por una protein-cinasa, mientras que la defosforilación es realizada por una proteína-fosfatasa. Ambas son reguladas por mecanismos en los que interviene la luz (Wang y Chollet, 1993). En las plantas CAM el ritmo circadiano de la planta controla la síntesis de la protein-cinasa responsable de la fosforilación nocturna de la PEPC (Bauwe y Chollet 1986).

El estado de agregación es otro de los mecanismos que han sido propuestos para la regulación de la actividad de PEPC en plantas C₄ y CAM. La enzima puede pu-

rificarse como un homodímero sensible a malato o como un homotetrámero insensible al mismo metabolito, con una K_i más de dos veces mayor que en la forma de dímero (Meyer *et al.* 1991). La primera forma de la enzima puede obtenerse cuando la planta ha sido expuesta a la luz y puede corresponder a la forma de día con baja actividad, mientras que la segunda forma corresponde a la enzima extraída de plantas expuestas a la oscuridad con mayor actividad. Las altas concentraciones de PEPC, PEP, Glu6P, Mg^{2+} (Meyer *et al.* 1991; Wu y Wedding 1987) y la presencia de cosolutos (Tovar-Méndez *et al.* 2000) también benefician la conversión de dímero a tetrámero, mientras que el malato favorece su forma dimerica (Meyer *et al.* 1991; Wu y Wedding 1987).

También se ha propuesto que por síntesis de novo puede estar regulada la expresión genética de la actividad de PEPC de hoja de maíz, ya que se ha observado que el aumento de la actividad está acompañada por un incremento en el ARNm y de proteína de PEPC. En la planta CAM *Mesembryanthemum crystallinum* durante el estrés por sal, la expresión de PEPC se incrementa entre 30-50 veces y este aumento está mediado por el incremento de la síntesis de ARNm y proteína (Chu *et al.* 1990).

La PEPC juega un papel importante en la respuesta al estrés osmótico en los vegetales, debido a que interviene en algunas de las respuestas más rápidas que tienen las plantas en este tipo de estrés. La respuesta de la planta puede variar según la severidad y duración del déficit de agua, del estado de desarrollo de la planta y de la especie. Algunas de las respuestas comunes más rápidas que tienen las plantas mesófitas a este tipo de estrés, son el cierre de los estomas (que por consecuencia disminuye la pérdida de agua por la transpiración y la fotosíntesis) (Edwards y Huber 1981), el ajuste osmótico, la inhibición del crecimiento y la producción y/o acumulación de osmolitos compatibles que son compuestos orgánicos neutros, osmóticamente activos (Low 1985).

La acumulación de osmolitos compatibles disminuye los potenciales de agua y le permite así amortiguar el efecto inmediato de la sequía dentro del organismo. Los osmolitos compatibles pueden continuar acumulándose durante déficits prolongados de agua, se ha propuesto, que podrían estabilizar la estructura terciaria de las proteínas cuando la célula se deshidrata (Low 1985). Sin embargo, el significado de cada mecanismo de protección permanece sujeto a polémica (Munns 1993).

La prolina es uno de los osmolitos compatibles más ampliamente distribuidos, se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre el aumento de los niveles de prolina celular y la capacidad de sobrevivir al déficit de agua o al incremento de la salinidad en el medio (De-launey y Verma 1993). El glutamato es un precursor de la prolina, que se sintetiza a través de la serie de reacciones mostradas en la Figura 2.

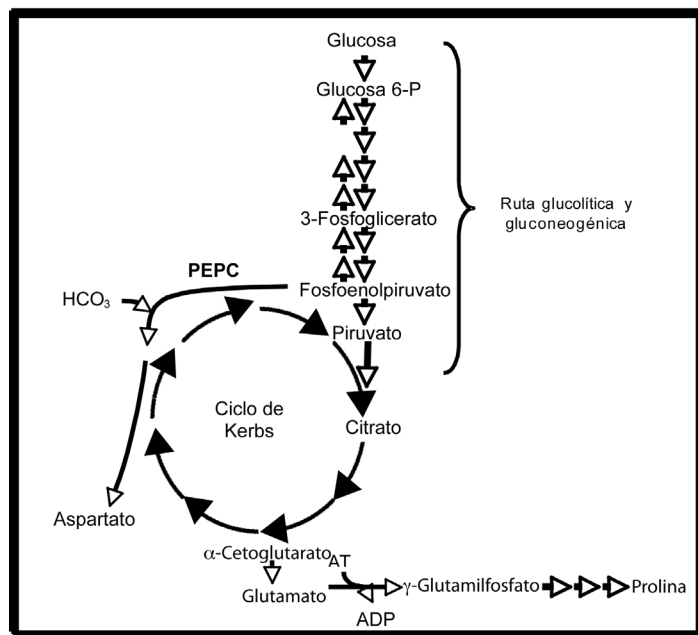


FIGURA 2. REACCIONES ANAPLERÓTICAS DE PEPC EN EL METABOLISMO DE LAS PLANTAS

La asimilación de carbono en las plantas mediante la fotosíntesis disminuye por déficit de agua (Hanson y Tully 1979), mientras que algunos de los procesos metabólicos específicos como los involucrados en la síntesis de solutos compatibles se incrementan. La prolina se acumula en hojas de muchas plantas cuando son sometidas a déficit de agua, su síntesis se realiza a partir de glutamato, por lo que su formación podría requerir de una reacción anaplerótica, la cual en las plantas es catalizada por PEPC (Latzko y Kelly 1983). Este proceso de acumulación de prolina también se observa en maíz, existiendo una correlación significativa entre la actividad de PEPC, los niveles de proteína PEPC y el contenido de prolina en las hojas sometidas a déficit de agua (Rodríguez-Penagos y Muñoz-Clares 1999).

Otro mecanismo de respuesta al estrés hídrico de algunas plantas C_3 , es el cambio en la forma de asimilación de carbono a uno típico de plantas CAM, cuando se

someten a altas concentraciones de sales. Estas plantas exhiben bajo condiciones de estrés osmótico aumentos en la cantidad de ARNm y en la expresión de proteína de PEPC (Holtum y Winter 1982). Además, en esas plantas, el déficit de agua induce la aparición de novo de la isoforma específica PEPC-CAM (Chu y Wedding 1990) que difiere de las formas preexistentes C_3 en sus propiedades cinéticas (Slocombe *et al.* 1993). Las funciones descritas permiten entender la dimensión del papel que juega la PEPC en el metabolismo de los organismos que la contienen, especialmente para las plantas de interés económico, ya que esta enzima incrementa la producción por medio de la fotosíntesis para algunas especies (plantas C_4), o de adaptación a condiciones adversas a estrés hídrico como lo puede producir la sequía o las altas concentraciones de salinidad en los suelos como enzima anaplerótica.

La PEPC ha sido investigada intensivamente en plantas C_4 , CAM e intermedias C_3 - C_4 , se han desarrollado plantas C_3 transgénicas de papa y tabaco con promotores y genes de PEPC C_4 de hoja de maíz, para sobreexpresar la proteína obteniendo concentraciones mayores de malato, aunque no han tenido cambios fisiológicos significativos en la asimilación de CO_2 y en su punto de compensación, se han utilizado técnicas de transformación de plantas con *Agrobacterium* y los niveles de sobreexpresión han mejoraron los resultados, aumentando hasta tres o cuatro veces la concentración de PEPC (Matsuoka *et al.* 2001). A pesar de los progresos en la manipulación de los niveles de PEPC en plantas C_3 , no se han obtenido fenotipos deseables que aumenten la productividad en este tipo de vegetales debido a la dificultad del flujo metabólico, en donde comparten varias enzimas una ruta que también debe ser regulada y dificulta el control de la ruta, esto es un fenómeno que se debe resolver.

No debe olvidarse tampoco la función anaplerótica de la enzima, cuando es necesaria la biosíntesis de esqueletos para la regulación de otras funciones en la planta como son el desarrollo de semillas, frutos o producción de osmolitos compatibles que son necesarios para la mejor adaptación o aclimatación de las plantas.

Conclusiones

la PEPC es una enzima importante en la productividad de las plantas debido a que permite la asimilación más eficiente de CO_2 atmosférico por las plantas C_4 durante la fotosíntesis o cumple funciones de vital

importancia en condiciones de estrés osmótico y durante el desarrollo de los vegetales. Estas características la hacen atractiva para su estudio, lo que ha llevado a la manipulación genética por técnicas de transformación en varias especies para aumentar los contenidos de esta proteína y de esta manera aumentar la productividad de los cultivos, aunque se han tenido resultados de sobreexpresión, no han sido significativos. No obstante, hay resultados que muestran que es posible aumentar los niveles de PEPC fotosintético en plantas transformadas aumentando la concentración de la enzima y mejorando el uso eficiente de agua cuando ésta es limitada, pero aún falta por hacer más. Con la obtención de plantas transformadas eficientemente, los productos que surjan de estos serán beneficios para la sociedad **1**

Referencias Bibliográficas

- ANDREO, C.S.; GONZÁLEZ, D.,H.; IGLESIAS, A. A.
1987 Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213: 1-8.
- BANDURSKI, R.S.
1955 Further studies on the enzymatic synthesis of oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 217: 137-150.
- BAUWE, H.
1986 An efficient method for the determination of K_m values for HCO_3^- of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta.* 169: 356-360.
- BAUWE, H.; CHOLLET, R.
1986 Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from C_3 , C_4 and C_3 - C_4 intermediate species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 82: 695-699.
- BEAUDRY, R. M.; SEVERSON, R. F.; BLACK, C. C.; KAYS, Z. J.
1989 Banana ripening: Implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux and fructose-2,6-biphosphate concentration. *Plant Physiol.* 91: 1436-1444.
- COOMBS, J.; BALDREY, C. W.; BUCKE, C.
1973 The C_4 pathway in *Pennisetum purpureum*. The allosteric nature of PEP carboxylase. *Planta.* 110: 95-107.
- CHOLLET, R.; VIDAL, J. O'LEARY, M. H.
1996 Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Ann.*

- Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 273-298.
- CHU, C.; DAI, Z.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E.
1990 Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. Plant Physiol. 93: 1253-1260.
- DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S.
1993 Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 4: 215-223.
- DEROCHE, M.E.; CARRAYOL, E.
1988 Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. Physiol. Plant. 74: 775-782.
- EDWARDS, G. E.; HUBER, S. C.
1981 The biochemistry of plants. Hatch, M. D. y Boardman, N. K. Eds. Academic Press, N. Y. 8: 237-281.
- GONZÁLEZ, M.C.; OSUNA, L.; ECHEVARRIA, C.; VIDAL, J.; CEJUDO, F.
1998 Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains. Plant Physiol. 116: 1249-1258.
- HANSON, D.D., TULLY, R. E.
1979 Light stimulation of proline synthesis in water-stressed barley leaves. Planta. 145: 45-51.
- HATCH, M.D.
1978 Current topics in cellular regulation. Academic Press. U.S.A. 14: 1-27.
- HATCH, M.D.
1987 C₄ photosynthesis: a unique blend modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochem. Biophys. Acta. 895: 81-106.
- HATCH, M.D.; OSMOND, C.B.
1976 Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series, ed. M. Gibbs & E. Latzko. Springer, New York. 3: 144-184.
- HOLADAY, A.S.; BLACK, C. C.
1981 Comparative characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃, C₄ and C₃-C₄ intermediate *Panicum* species. Plant Physiol. 67: 330-334.
- HOLTUM, J.A.M.; WINTER, K.
1982 Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of *Crassulacean Acid Metabolism* in *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta. 155: 8-16.
- KHAYAT, E.; DUMBROFF, E. B.; GLICK B. R.
1991 The synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in imbibing sorghum seeds. Biochem. Cell Biol. 69: 141-145.
- KING, B. J.; LAYZELL, D. B.; CANVIN, D. T.
1986 The role of dark CO₂ fixation in root nodules of soybeans. Plant Physiol. 81: 200-205.
- LATZKO, E.; KELLY, G. J.
1983 The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. Physiol. Veg. 21: 805-815.
- LAW, R.D.; PLAXTON, W. C.
1995 Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. Biochem. J. 307: 807-816.
- LEBLOVÁ, S.; STAKOSOVA, A. A.; VOJTECKOVA, M.
1991 Regulation of the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from germinating maize (*Zea mays* L.) seeds by some metabolites. Biol. Plant. 33: 66-74.
- LEPENIEC, L.; VIDAL, J.; CHOLLET, R.; GADAL, P.; CRETIN, C.
1994 Phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and evolution. Plant Sci. 99: 111-24.
- LOW, P.S.
1985 Transport processes, ionic and osmoregulation. R. Gillies and M. Gillies-Baillien, eds Springer Verlag. Berlin. pp. 469-477.
- MARTINOIA, E.; RENTSCH, D.
1994 Malate compartmentalization: Responses to a complex metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 447-467.
- MATSUMURA, H.; TERADA, M.; SHIRAKATA, S.; INOUE, T.; YOSHINAGA, T.; IZUI K.; KAI, Y.
1999 Plausible phosphoenolpyruvate binding site revealed by 2.6 Å structure of Mn²⁺-bound phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 458 (2): 93-96.
- MATSUOKA, M.; FURBANK, R.; FUKAYAMA H.; MIYAO, M.
2001 Molecular engineering of C₄ photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 297-314.
- MEYER, C.R.; WILLEFORD, K. D.; WEDDING, R.T.
1991 Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*, effect of incubation with ligands and dilution on oligomeric state, activity and allosteric properties. Arch. Biochem. Biophys. 288: 343-349.

- MILLER, S. S.; BOYLAN, K. L. M.; VANCE, C. P.
1989 Alfalfa root nodule CO₂ fixation. III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 84: 501-508.
- MUNNS, R.
1993 Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypothesis. *Plant Cell Environ.* 16: 15-24.
- NISHIKIDO, T.; TAKANASHI, H.
1973 Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C₄ plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53:126-133.
- O'LEARY, M.H.
1982 Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 297-315.
- PACQUIT, V.; SANTI, S.; CRETIN, C.; BUI, V. L.; VIDAL, J.; GADAL, P.
1993 Production and properties of recombinant C₃-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: in vitro phosphorylation by leaf and root. *Pyr Pc. Protein serine kinases. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1415-1423.
- PODESTÁ, F.E.; PLAXTON, W.C.
1994 Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta.* 194: 381-387.
- RELLE, M.; WILD, A..
1996 Molecular characterization of a phosphoenolpyruvate carboxylase in the gymnosperm *Picea abies* [Norway spruce]. *Plant Mol. Biol.* 32: 923-936.
- RODRÍGUEZ-PENAGOS, M.; MUÑOZ-CLARES, R. A.
1999 Response of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves to moderate water deficit. *J. Plant Physiol.* 155: 631-638.
- RODRÍGUEZ-SOTRES, R.; MUÑOZ-CLARES R. A.
1990 Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 180-190.
- SAKO, Y.; TAKAI, K.; UCHIDA, A.; ISHIDA, Y.
1996 Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermobacter sociabilis*. *Febs Let.* 392: 148-152.
- SANGWUAN, R.S.; SINGH, N.; PLAXTON, W. C.
1992 Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating castor oil seeds. *Plant Physiol.* 99: 445-449.
- SCHUBERT, K.R.
1986 Products of biological N₂ fixation in the higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 537-574.
- SLOCOMBE, S.P.; WHITELAM, G. C.; COCKBURN, W.
1993 Investigation of phosphoenolpyruvate (PEPcase) in *Mesembryanthemum crystallinum* L. in C₃ and CAM photosynthesis states. *Plant Cell Environ.* 16: 403-411.
- TARCZYNSKI, M. C.; OUTLAW, W. H.
1993 The interactive effects of pH, L-malate and glucose-6-phosphate on guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 103: 1189-1194.
- TING, I.P.
1985 Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 595-622.
- TING, I.P.; OSMOND, C. B.
1973 Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C₃ and C₄ plants. *Plant Physiol.* 51: 439-447.
- TOVAR-MÉNDEZ, A.; MÚJICA-JIMÉNEZ, C.; MUÑOZ-CLARES, R. A.
2000 A. Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 123: 149-160.
- TOVAR-MÉNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-SOTRES, R.; LÓPEZ-VALENTIN, D. M.; MUÑOZ-CLARES, R. A.
1988 Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*. *Biochem. J.* 332: 633-642.
- VANCE, C.P.; GREGERSON, R. G.; ROBINSON, D. L.; MILLER, S. S.; GANTT, J. S.

- 1994 Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101: 51-64.
- WANG, Y. H.; CHOLLET, R.
- 1993 In vitro phosphorylation of purified tobacco leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS lett.* 328: 215-218.
- WELKIE, G.W.; COLDWELL, M.
- 1970 Leaf anatomy of species in some dicotyledonous families as related to the C_3 or C_4 pathways on carbon fixation. *Can. J. Bot.* 48: 2135-2146.
- WESTHOFF, P.; GOWICK, U.
- 2004 Evolution of C_4 Phosphoenolpyruvate Carboxylase, genes and proteins: A case Study with the genus *Flaveria*. *Ann. of Bot.* 93: 13-23.
- WU, M.X.; WEDDING, R.T.
- 1987 Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*: Further evidence on the dimer-tetramer interconversion. *Plant Physiol.* 84: 1080-1083.