

## **Capítulo IX**

### **Fotosíntesis:**

## **La asimilación de CO<sub>2</sub> y síntesis de azúcares en las plantas**

Liliana Cardemil<sup>1</sup>

### **INTRODUCCIÓN**

Las plantas fijan anualmente 10<sup>12</sup> toneladas de CO<sub>2</sub>. Un 40 % de esta fijación ocurre en ecosistemas acuáticos y otro 60 % ocurre en los ecosistemas terrestres. Los ecosistemas de bosques y selvas son los principales contribuyentes fotosintéticos, a estos se les consideran "los grandes pulmones de la tierra" puesto que entregan O<sub>2</sub> junto con asimilar CO<sub>2</sub>.

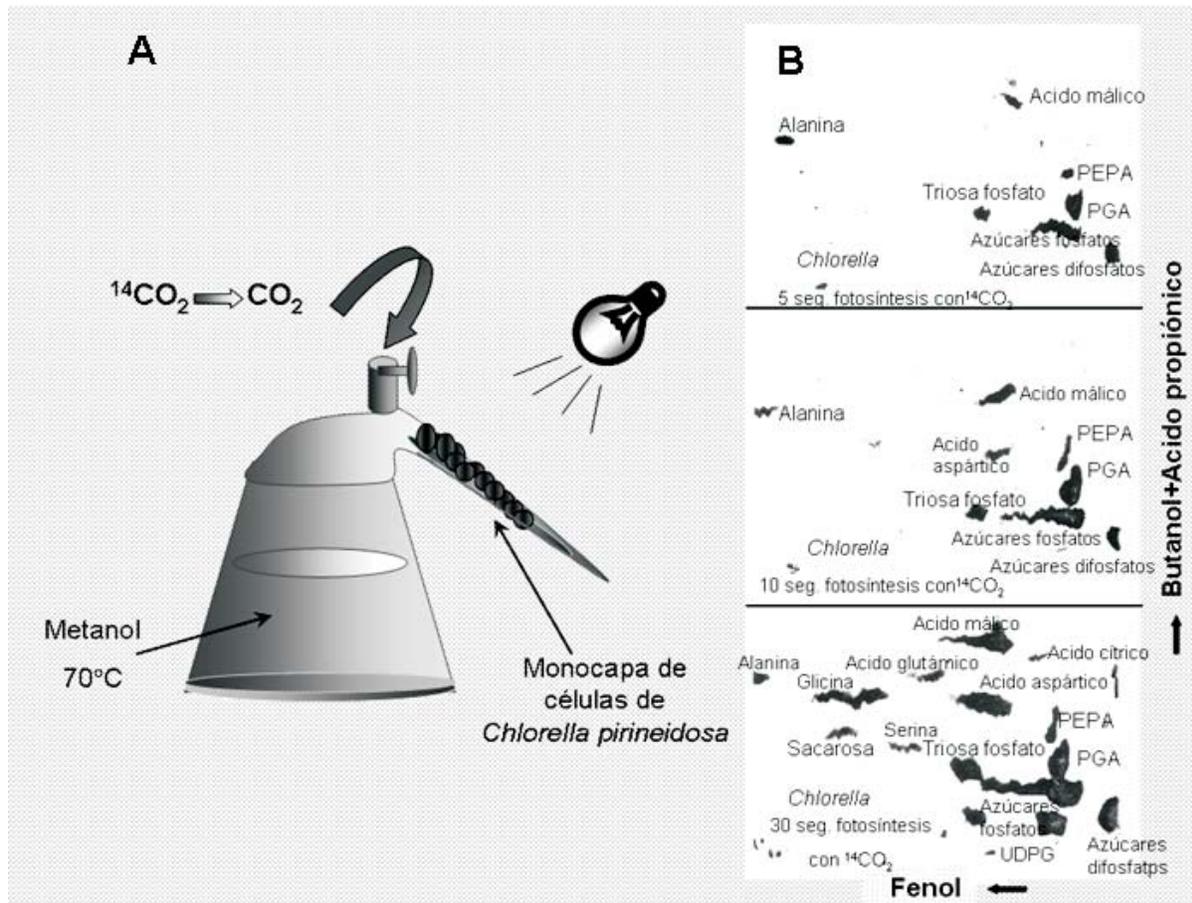
Como las plantas hacen esta fijación fue el gran objetivo que tuvieron los fisiólogos vegetales en la primera mitad del siglo XX, llegando al consenso que las plantas usan la luz para la síntesis de poder reductor en forma de NADPH y de energía de enlace químico en forma de ATP, y que ambos son usados para la asimilación del carbono.

Históricamente no fue fácil deducir la vía de fijación de CO<sub>2</sub> ya que las hojas de plantas son anatómicamente muy complejas. Tienen varias capas de células con cloroplastos, muchos cloroplastos por células (aproximadamente de 50-100) y por lo tanto, técnicamente es muy difícil sincronizar este sistema tan complejo, de manera que todos los cloroplastos de la hoja o incluso todos los cloroplastos de una sola célula pudieran iniciar al mismo tiempo las reacciones enzimáticas que implica la asimilación de CO<sub>2</sub>.

Fue la genialidad de Melvin Calvin, la que junto a la de otros investigadores como Andrew Benson y James A. Bassham, lo que hizo posible descifrar la vía metabólica por medio de la cual el cloroplasto fija CO<sub>2</sub> y sintetiza azúcares (Benson, 1950). Para este estudio, ellos decidieron no tomar una hoja de planta, sino organismos fotosintéticos unicelulares que poseen un único gran cloroplasto por célula. El alga unicelular utilizada fue *Chlorella pyrenoidosa* o la cianobacteria *Scenedesmus* sp. que tiene la estructura de un cloroplasto.

Para esto, construyeron una cámara de incubación donde las células de estas algas podían ubicarse en una sola capa de células en un tubo capilar (Fig. 1). Las células en el capilar eran colocadas en la oscuridad, a las que se les hacía llegar luz y CO<sub>2</sub> marcado con <sup>14</sup>C por breves períodos de tiempo, tan corto como un segundo. La luz sincronizó a los cloroplastos de esta capa unicelular y todos ellos

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.  
E-mail: lcardemi@uchile.cl



**Fig. 1.** Enfoque metodológico de Melvin Calvin y colaboradores para determinar las secuencias de las reacciones que ocurren en la asimilación de  $\text{CO}_2$  por el organismo fotosintetizador. La secuencia fue estudiada desde la primera reacción hasta la síntesis de azúcares y recuperación del sustrato. A. Muestra un diagrama de una retorta con un tubo capilar donde ubicó a las células de *Chlorella pyrenoidosa* en una sola capa de manera que todos los cloroplastos de las células (cada célula tiene un solo cloroplasto) recibieran la misma cantidad de luz y al mismo tiempo. Por el tubo superior se hacía llegar  $^{14}\text{CO}_2$  por el breve tiempo en que entregaba la luz (tan corto como 1 segundo), y luego se lavaba con  $\text{CO}_2$  frío (experimento de pulso y lavado). El matraz contiene metanol a  $70^\circ\text{C}$  donde Calvin dejaba caer las células para detener las reacciones. El metanol además extraía los compuestos sintetizados. B. Muestra tres cromatografías bidimensionales en papel a diferentes tiempos de iluminación. Los compuestos fueron identificados en el papel por revelado con una placa fotográfica de las manchas dejadas por los compuestos radioactivos.

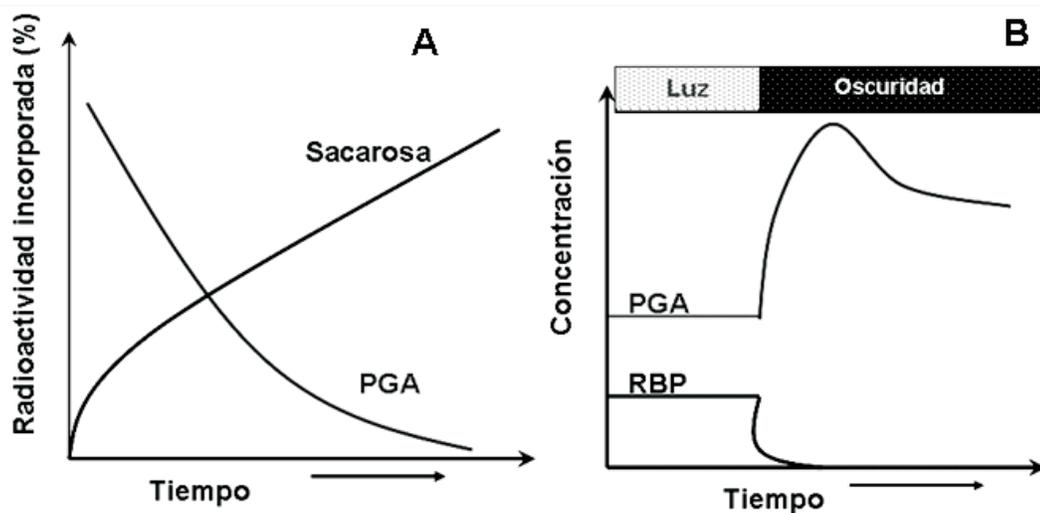
comenzaron a asimilar  $\text{CO}_2$  al mismo tiempo que se encendía la luz. Después de la breve incubación de  $^{14}\text{CO}_2$ , cortaban el suministro de  $^{14}\text{CO}_2$  y lo reemplazaron por  $\text{CO}_2$  frío. Los experimentos realizados en esta forma (incubación con  $^{14}\text{CO}_2$  seguida de incubación con  $\text{CO}_2$  frío), se denominan experimentos de pulso y lavado. Esta metodología permitió entender la secuencia temporal en que se marcaban los compuestos con radioactividad. Luego, las reacciones enzimáticas eran detenidas dejando caer a las células en el metanol a  $70^\circ\text{C}$ , solvente que también extrae los azúcares y compuestos orgánicos que se sintetizan. Los compuestos extraídos con el metanol a  $70^\circ\text{C}$  fueron analizados por cromatografía bidimensional en papel. Los compuestos retenidos por el papel eran visualizados por impresión de una placa fotográfica (autoradiografía), gracias a la radioactividad que ellos contenían (Fig. 1).

**Calvin y colaboradores deducen que un ácido de tres átomos de carbono es el primer compuesto que se sintetiza en la fijación de  $\text{CO}_2$**

Realizando estos experimentos de pulso y caza en estas algas unicelulares sincronizadas por luz y

dando  $\text{CO}_2$  radioactivo por muy cortos tiempos, Calvin llegó a la conclusión que el primer compuesto sintetizado era el ácido 3 fosfoglicérico (3-PGA), molécula que posee tres átomos de carbono.

Siguiendo la cinética de marcación por radioactividad, Calvin y su grupo pudieron comprobar que el 3-PGA era el primer precursor de la síntesis de sacarosa ya que en el tiempo, a medida que este compuesto perdía radioactividad, ésta aparecía en la sacarosa (Fig. 2A).



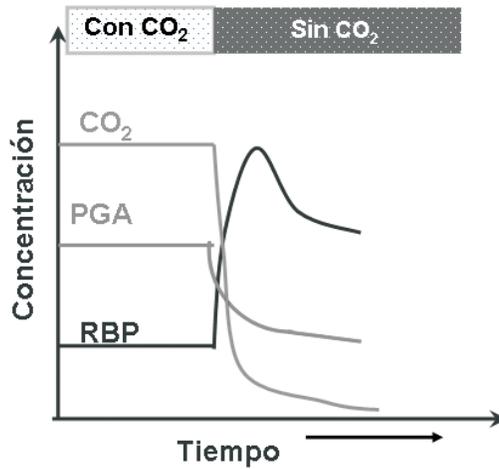
**Fig. 2.** Experimentos de Calvin y colaboradores que confirmaron que el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) es el precursor de la síntesis de sacarosa y el primer compuesto estable sintetizado. A. Cinética de decaimiento de la radioactividad contenida en el 3-PGA y aumento de esta radioactividad en la sacarosa. Ambas curvas tienen la misma pendiente. B. Muestra un experimento de Calvin y su grupo donde cortaron la luz después de un breve tiempo de exposición. El único compuesto que se acumula en estas circunstancias es el 3-PGA, lo que demuestra que efectivamente este es el primer compuesto estable sintetizado. La radioactividad de la 1,5-RuBP cae a cero, lo que indicó a Calvin que posiblemente esta azúcar es el sustrato que recibe al  $\text{CO}_2$  en la primera reacción.

Calvin y su grupo verificaron que el primer compuesto sintetizado era efectivamente el 3-PGA. Para ello, en otro experimento dieron luz a las células al mismo tiempo que hacían llegar  $^{14}\text{CO}_2$  por un corto tiempo y apagaron la luz repentinamente ya que en los experimentos previos Calvin había llegado a la conclusión que las enzimas que catalizaban estas reacciones eran todas activadas por la luz. Por lo tanto, se postuló que al cortar la luz después de un corto tiempo sólo la primera enzima alcanzaría a actuar y el compuesto que se acumularía sería el 3-PGA. Sin estar las otras enzimas activas, el 3-PGA no puede ser transformado a los compuestos que se sintetizan posteriormente a partir de él y por lo tanto, se acumularía. Efectivamente, el único compuesto acumulado en el tiempo fue el 3-PGA (Fig. 2B).

### **Calvin y colaboradores determinaron que una azúcar de cinco átomos de carbono recibe al $\text{CO}_2$ y es el sustrato aportado por la planta**

La otra pregunta que intrigó a este grupo de investigadores fue establecer que compuesto era el que recibía al  $\text{CO}_2$  para formar el 3-PGA. La sospecha había recaído en una azúcar de 5 átomos de carbono que es la ribulosa 1,5 difosfato (1,5 RuBP), ya que en esta azúcar la radioactividad caía a 0, cuando la luz se cortaba repentinamente tal como ocurre en el experimento de la Figura 3. Por esta razón ellos realizaron otro experimento de pulso y lavado usando  $^{14}\text{CO}_2$  por un periodo más largo, lavando con  $\text{CO}_2$  y luego cortaron repentinamente el suministro de  $\text{CO}_2$ . En este caso al cortar el suministro de  $\text{CO}_2$ , la primera enzima que es la que fija el  $\text{CO}_2$ , no puede actuar ya que el  $\text{CO}_2$  es el

FOTOSINTESIS: FASE OSCURA



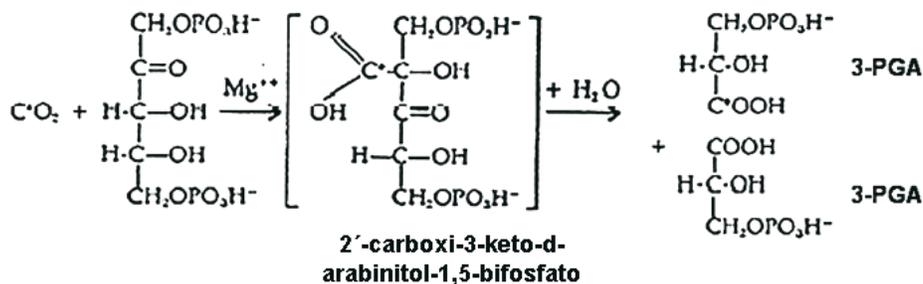
**Fig. 3.** Experimento de Calvin y colaboradores que identificó la 1,5 ribulosa bifosfato (1,5-RuBP) como el sustrato que recibe el CO<sub>2</sub> para formar dos moléculas de 3-PGA. En este experimento Calvin mantuvo el CO<sub>2</sub> radioactivo por un corto tiempo y luego cortó repentinamente el suministro del CO<sub>2</sub> lo que trajo como consecuencia la acumulación de la 1,5-RuBP ya que no existiendo el otro sustrato, la 1,5 RuBP no puede entrar en la reacción y se acumula. El 3-PGA cae a cero porque no se puede sintetizar sin CO<sub>2</sub>.

sustrato y éste no está disponible. El segundo sustrato de esta enzima y que es el que recibe al CO<sub>2</sub> tiende a acumularse porque no puede entrar en la reacción enzimática por estar ausente el CO<sub>2</sub> (Fig. 3). Efectivamente, el compuesto acumulado al cortar el suministro de CO<sub>2</sub> fue la 1,5 RuBP.

**Calvin y colaboradores postularon que un compuesto inestable de 6 átomos de carbono posiblemente se forma en el sitio activo de la enzima**

Todos estos resultados llevaron a Calvin a postular que posiblemente un compuesto de seis átomos de carbono se formaba en el seno de la enzima, compuesto que seguramente era inestable y se descomponía formando dos moléculas de 3-PGA. Siendo la 1,5 RuBP una azúcar de 5 átomos de carbono debía recibir a una molécula de CO<sub>2</sub> lo que haría una molécula de 6 átomos de carbono, que casi instantáneamente daría origen a dos moléculas de 3 átomos de carbono, es decir, 2 moléculas de 3-PGA (Fig. 4). De ser así, sólo una molécula de las dos moléculas de 3-PGA que se sintetizan se marcaría con <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Efectivamente se comprobó que en el primer ciclo sólo la mitad de las moléculas de 3-PGA se marcan radioactivamente.

L a verificación



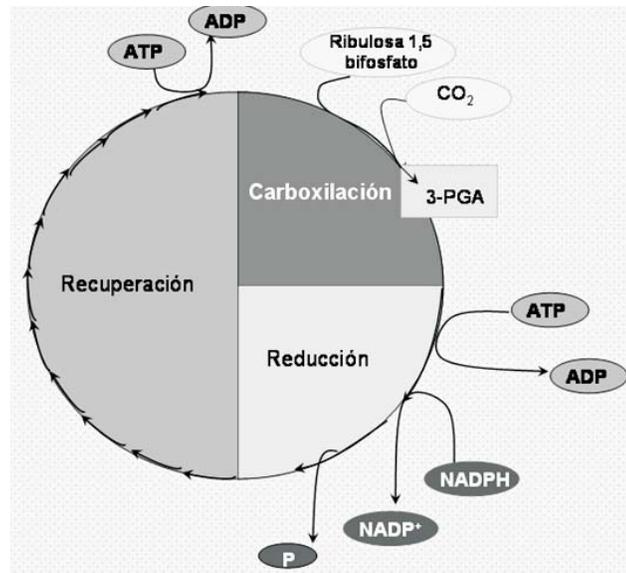
**Fig. 4.** Compuesto de 6 átomos de carbono, intermediario inestable que se forma en el seno de la enzima Rubisco. El 2'-carboxi-3-keto-d-arabinitol-1,5-bifosfato fue postulado por Calvin como el primer compuesto sintetizado en este ciclo, ya que siendo la 1,5 RuBP una azúcar de 5 átomos de carbono y el 3-PGA un compuesto de 3 átomos de carbonos y siendo 2 las moléculas de 3-PGA que se sintetizan en la primera reacción, era fácil predecir que este compuesto de 6 átomos de carbono se formaba en el seno catalítico de la enzima. La presencia de este compuesto fue verificada por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear de 5 g de enzima pura que fue incubada con los sustratos por 20 milisegundos y después detenida la reacción por muerte de la enzima (Andersson y col. 1989).

de que efectivamente se forma este compuesto de 6 átomos de carbono inestable en el seno de la enzima la realizaron muchos años después. Investigadores de la Dupont Chemical Company, liderados por George Lorimer (Andersson y col. 1989). Para esto, ellos purificaron la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa, llamada también Rubisco. Luego tomaron 5 gramos de enzima pura y le hicieron llegar  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  y 1,5 RuBP e incubaron la enzima con los sustratos por 20 milisegundos. Después de este pequeñísimo tiempo de incubación, denaturaron los 5 gramos de enzima pura y analizaron los productos obtenidos por resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X. Ellos pudieron comprobar la formación del compuesto inestable de 6 átomos de carbono en el seno de la enzima que resultó ser el 2'-carboxi-3-keto-d-arabinitol-1,5-bisfosfato.

### La mayoría de las reacciones que se inician con la síntesis del 3-PGA conducen a la recuperación del sustrato de 5-carbonos

Los experimentos de pulso y lavado de Calvin permitieron dilucidar toda la vía de asimilación de  $\text{CO}_2$  por la planta. En estas reacciones (cada una de ellas catalizada por una enzima específica), se gasta ATP y NADPH, los dos compuestos productos finales de la transformación de la energía luminosa en energía de enlace químico por el cloroplasto. De estas reacciones, sólo las primeras reacciones están destinadas a producir azúcares de 6 átomos de carbono. Un tercio de estas primeras reacciones va a la síntesis de sacarosa. Los otros dos tercios van a recuperar la 1,5 RuBP. De manera que las reacciones en su conjunto constituyen un ciclo, ya que en la primera reacción se gasta 1,5 RuBP y al final del ciclo se recupera este compuesto en la misma cantidad que se gastó. Por esta razón, todas estas reacciones constituyen el denominado ciclo de Calvin-Benson.

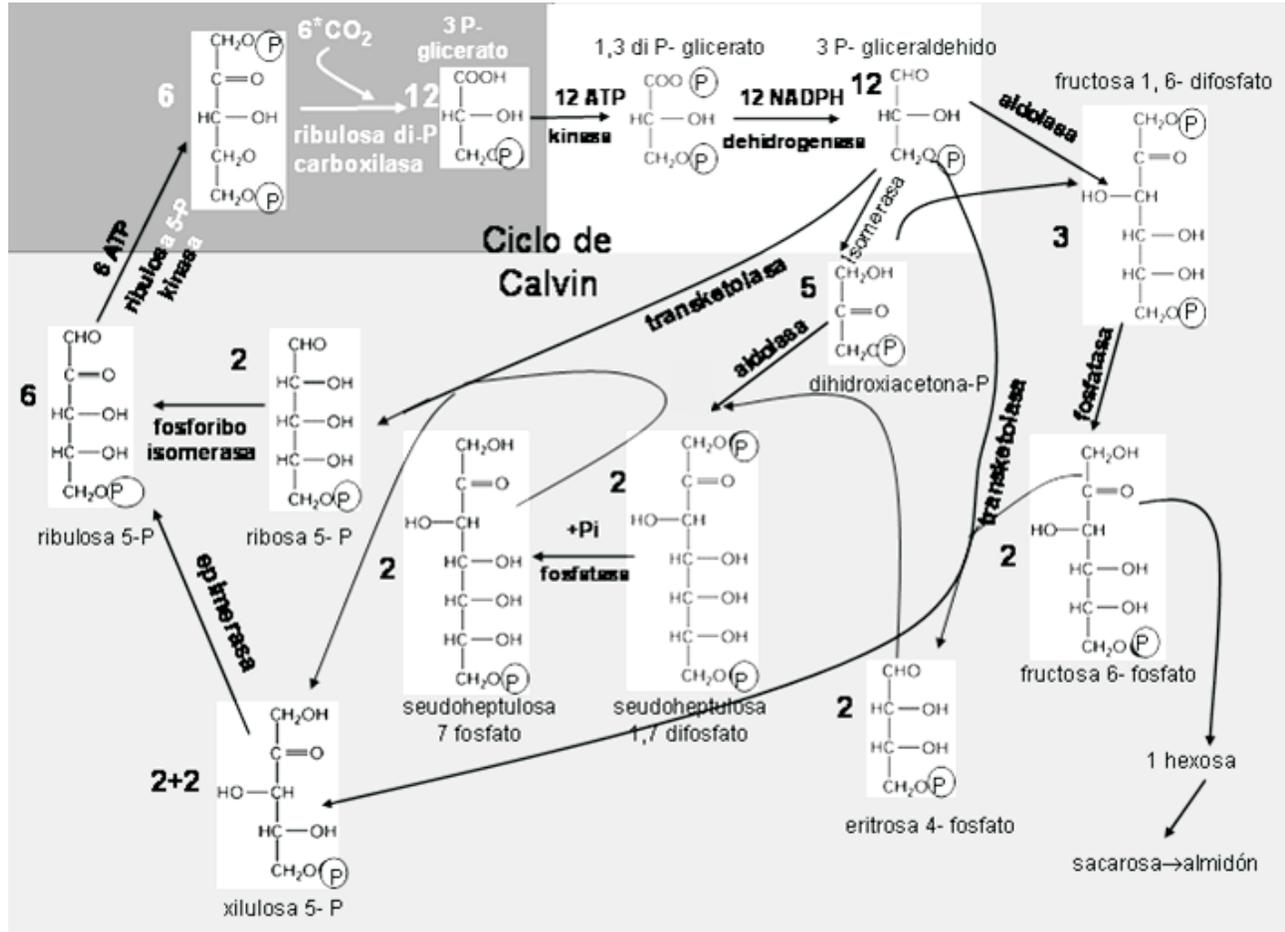
El ciclo se puede dividir en tres etapas (Fig. 5): a) Etapa de carboxilación, b) Etapa de reducción, y c) Etapa de regeneración. Note que la etapa 3 es la más larga y lleva a la recuperación de 1,5 RuBP.



**Fig. 5.** Etapas del Ciclo de Calvin-Benson. Se puede apreciar el ciclo comprende tres etapas. En la segunda etapa se gasta 2/3 del ATP total que el ciclo requiere y todo el poder reductor en forma de NADPH. En la última reacción de la etapa de recuperación se gasta el resto del ATP, 1/3 del total.

**Etapa de carboxilación.** La primera etapa de carboxilación comprende la reacción de carboxilación y es catalizada por la Rubisco. Esta es la enzima más abundante del cloroplasto y probablemente la enzima más abundante de la biosfera. Se activa por la luz tomando los dos sustratos, 1,5 RuBP y  $\text{CO}_2$ , los que una formando el compuesto inestable de 6 átomos de carbono que es el 2'-carboxi-3-keto-d-arabinitol-1,5-bisfosfato (Fig. 4). Como es inestable, el intermediario se desdobra inmediatamente en dos moléculas de 3-PGA. De las dos moléculas que se forman

cuando se da un pulso de  $^{14}\text{CO}_2$  seguido de lavado con  $\text{CO}_2$ , sólo una molécula de 3PGA sintetizada es radioactiva (Fig. 4 y 6).



**Fig. 6.** Ciclo de Calvin-Benson. La figura muestra todas las reacciones del ciclo y la estequiometría de estas reacciones considerando que en el ciclo entran en reacción 6 moléculas de 1,5 RuBP y 6 moléculas de  $\text{CO}_2$ . Las tres etapas del ciclo están marcadas con diferentes tonos de grises. La etapa de carboxilación es gris oscuro, la etapa de reducción es blanca y la etapa de regeneración del sustrato es gris claro. Las enzimas están identificadas para cada reacción.

**Etapas de reducción.** La segunda etapa comprende la fosforilación del 3-PGA a ácido 1,3 difosfoglicérico (1,3-PGA) por medio de una cinasa y con gasto de ATP. Inmediatamente el 1,3-PGA es reducido por la enzima gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa quien usa el NADPH como agente reductor para dar 3-fosfo-gliceraldehido (3-GAP). Así, parte del ATP y el NADPH sintetizados en las reacciones de transformación de la luz en energía de enlace químico son gastados en las dos primeras reacciones (Fig. 6).

**Etapas de regeneración.** A esta reacción le sigue la isomerización de parte de las moléculas de 3-GAP sintetizadas a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En la próxima reacción una molécula de 3-GAP y una de DHAP se condensan por acción de una aldolasa para entregar el primer compuesto de 6 carbonos que es la fructosa 1,6 difosfato (1,6-FruDP). Esta se defosforila por acción de una fosfatasa para dar una molécula fructosa 6 fosfato (6-FruP). Si en el ciclo entran 6 moléculas de 1,5-RuBP y 6 moléculas de  $\text{CO}_2$  se formarán 3 moléculas de 1,6-FruBP y subsecuentemente 3 moléculas de 6-FruP. Sin embargo, la ganancia en Fru-6P que va a la síntesis de sacarosa es sólo de una molécula. Las otras dos Fru-6P siguen el ciclo y van a recuperar a la 1,5- RuBP (Fig. 6).

Si se analizan las reacciones que ocurren hasta la formación de 6-FruP y las enzimas que las

catalizan, ellas nos recuerdan a la reacciones de la glicólisis, sólo que la secuencia de estas reacciones son en la dirección contraria.

Las reacciones que ocurren a continuación son reacciones únicas del Ciclo de Calvin-Benson y muchas de ellas catalizadas por enzimas que sólo se encuentran en las cianobacterias y plantas.

Así, las dos moléculas de 6-FruP que van a la recuperación de la 1,5-RuBP, entran en reacción con 2 moléculas de 3-GAP catalizada por una transketolasa, para dar dos moléculas de azúcares de 5 átomos de carbono que son de xilulosa 5 bifosfato (5-XuP) y dos moléculas de 4 átomos de carbono, que son de eritrosa 4 fosfato (4-EriP). Las dos moléculas de 4-EriP reaccionan cada una con una molécula de DHAP para dar dos moléculas de pseudoheptulosa 1,7 difosfato, azúcar de 7 átomos de carbono (1,7-ShepBP). Esta reacción es catalizada por una aldolasa que sólo participa en este ciclo.

La 1,7-ShepBP se defosforila por acción de una fosfatasa a pseudoheptulosa 7 fosfato (7-ShepP), formándose dos moléculas de esta azúcar que posteriormente reacciona con dos moléculas de 3-GAP para dar dos moléculas de 5 átomos de carbono: una de ribosa 5 fosfato (5-RiP) y otra de xilulosa 5 fosfato (5-XuP).

Las dos moléculas de 5-RiP que se forman son transformadas a dos moléculas de ribulosa 5-fosfato (5-RuP) por acción de una isomerasa, mientras que las 2 moléculas de 5-XuP son transformadas a 5-RuP por acción de una epimerasa.

Como anteriormente se habían formado otras dos moléculas de 5-XuP en la reacción de 6-FruP con la 3-GAP, son 4 las moléculas de 5-XuP que forman 5-RuP. Así en el ciclo se forman 6 moléculas de 5-RuP. Estas 6 moléculas de 5-RuP se fosforilan por acción de una kinasa a 1,5-RuBP. En esta reacción se vuelve a gastar ATP proveniente de la fase clara de la fotosíntesis para dar 6 moléculas de 1,5-RuBP. Recordemos que en el ciclo de Calvin-Benson se inició con 6 moléculas de 1,5-RuBP y 6 moléculas de  $\text{CO}_2$ , por lo tanto, se recuperan estas 6 moléculas de sustrato.

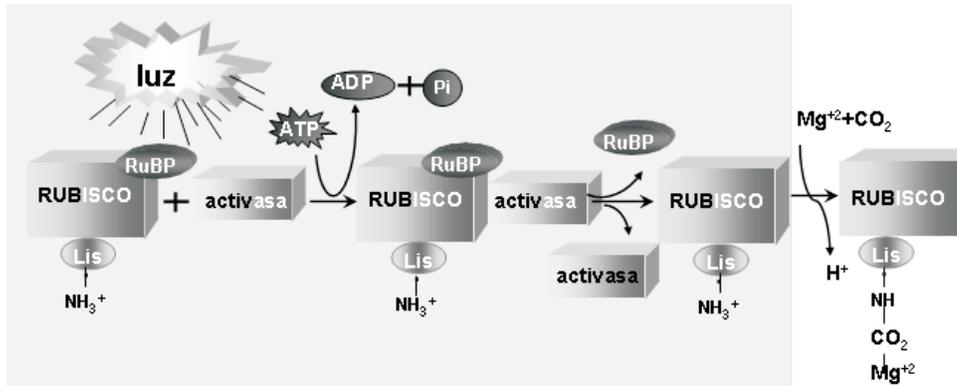
### **Todas las enzimas del Ciclo son activadas por la luz**

Muy pronto después que los primeros compuestos sintetizados fueron identificados, Calvin y colaboradores llegaron a la conclusión que las enzimas que catalizaban cada reacción eran activadas por la luz. Por esta razón, en los experimentos para ratificar que el primer compuesto sintetizado era el 3-PGA, los investigadores cortaron la luz después de entregar  $^{14}\text{CO}_2$ . El compuesto acumulado era el 3-PGA, puesto que sólo alcanzaba a actuar la Rubisco y el resto de las enzimas del ciclo se inactivaban por falta de luz.

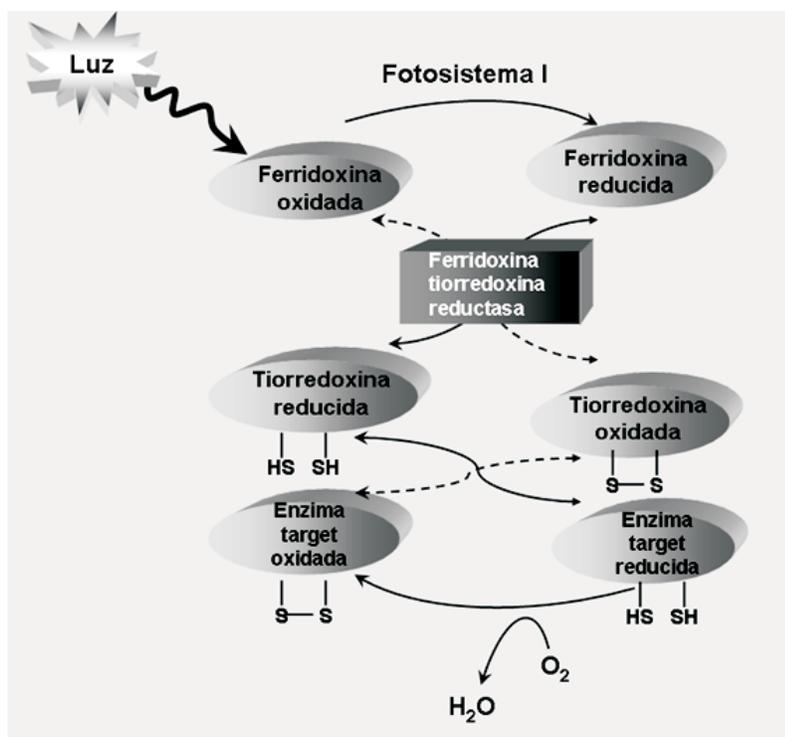
Sin embargo, la Rubisco (ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa), que es la primera enzima del ciclo de Calvin-Benson, se activa por la luz por un mecanismo diferente al de activación del resto de las enzimas del ciclo.

En la activación de la Rubisco hay dos etapas: En la primera etapa una enzima, la activasa que se activa sólo con luz, usando ATP, libera del sitio activo a la 1,5-RuBP que siempre queda atrapada dentro de la enzima. Segundo, una vez que la Rubisco queda libre de la 1,5-RuBP, se carbamila; es decir, une una molécula de  $\text{CO}_2$  en el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la enzima. Esta reacción es catalizada por una anhidrasa carbónica. El grupo carbamilo une inmediatamente una molécula de magnesio, formando un carbamilo de magnesio y quedando así la enzima lista para recibir ahora a los dos sustratos  $\text{CO}_2$  y 1,5 RuBP en su sitio activo. La carbamilación y unión con magnesio está también indirectamente regulado por la luz, ya que la luz promueve el acúmulo de protones y magnesio en el lumen de la vesícula tilacoidal (Fig. 7).

El resto de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson se activan por la luz por el sistema ferridoxina-tiorredoxina (Fig. 8). La ferridoxina, una proteína Fe-S se reduce al recibir electrones del Fotosistema I. Esta proteínas como se ha señalado en el Capítulo 8, es la proteína que en último término recibe el electrón de los aceptores de hierro azufre (Fe-S) del Fotosistema I. Cuando recibe



**Fig. 7.** Activación de la Rubisco por luz. La luz activa indirectamente a la Rubisco. Es la enzima activasa la que se activa directamente por luz. Después que la activasa saca a la 1,5-RuBP del seno de la subunidad grande, ésta se carbamila en el ε-amino de un residuo de lisina donde entra una molécula de CO<sub>2</sub>. A este CO<sub>2</sub> se une a continuación magnesio.



**Fig. 8.** Activación por luz de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson. Todas las enzimas que participan en las reacciones del ciclo de Calvin-Benson, con excepción de la Rubisco, son activadas por luz a través de las reacciones del sistema ferridoxina-tiorredoxina reductasa. Todas las enzimas de este ciclo deben estar en su estado reducido para poder actuar. En este sistema, la ferridoxina actúa como donador de electrones. La ferridoxina es un producto de las reacciones luminosas y se sintetiza en la transferencia de electrones que realiza el Fotosistema I. La enzima ferridoxina-tiorredoxina reductasa transfiere electrones de la ferridoxina a la tiorredoxina, que es una proteína que contiene azufre y ésta, a su vez, transfiere electrones a la enzima objetivo.

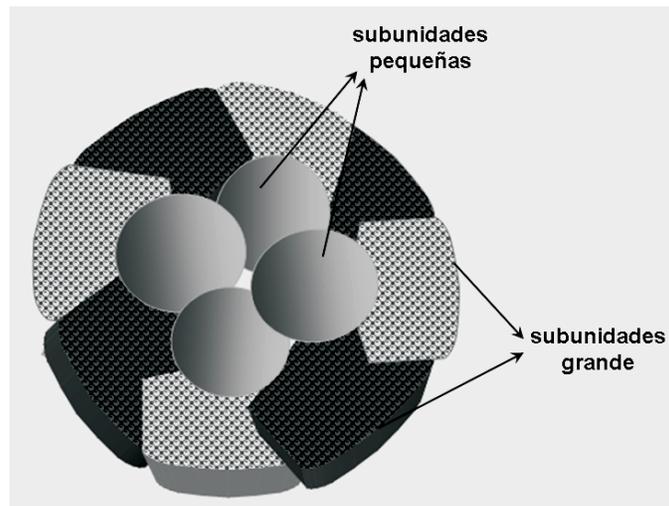
el electrón, se moviliza fuera del Fotosistema I hacia el estroma donde puede entregar el electrón al NADP<sup>+</sup> que se reduce a NADPH, reacción que es mediada por la enzima ferridoxina NADP<sup>+</sup> reductasa.

La ferridoxina puede también transferir este electrón a otras proteínas, además del NADP<sup>+</sup>. Así, en este caso, la ferridoxina reducida transfiere el electrón a la tiorredoxina, una proteína disulfuro. La transferencia de electrones desde la ferridoxina a la tiorredoxina es catalizada por la enzima

ferridoxina tiorredoxina reductasa. En el esquema de la Figura 8, la transferencia de electrones a las enzimas objetivo (enzimas del ciclo de Calvin-Benson) se muestra con flechas de línea sólida, en cambio la oxidación de las enzimas objetivo se muestra con flechas punteadas.

### **De todas las enzimas del Ciclo de Calvin-Benson, la Rubisco es la enzima más compleja**

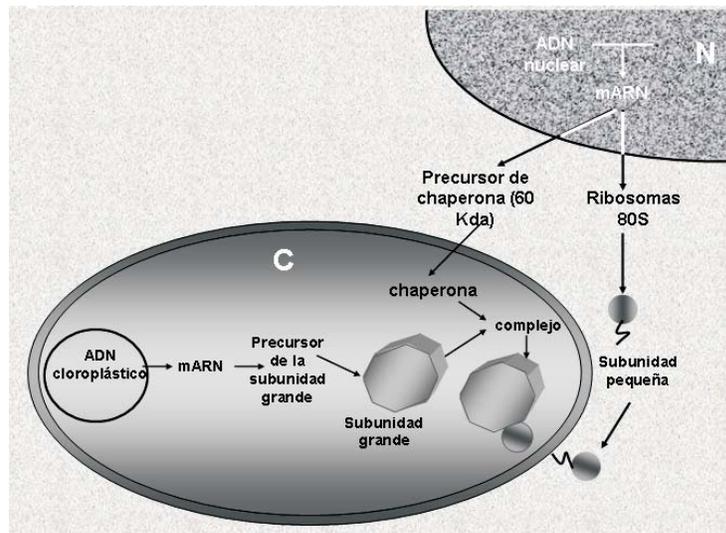
La Rubisco es una enzima muy grande de aproximadamente 450 KDa de tamaño, constituida por 8 subunidades grandes y 8 subunidades pequeñas. Las subunidades grandes tienen una masa molecular de 45 KDa, mientras que las subunidades pequeñas tienen un tamaño de 15 KDa. La Figura 9 muestra un modelo de la enzima vista desde arriba. Se puede apreciar que las 8 subunidades grandes rodean a 4 de las subunidades pequeñas. Las otras 4 subunidades pequeñas están debajo de las otras cuatro y no son visibles en el modelo. El sitio catalítico de la enzima está en la subunidad grande. La función de la subunidad pequeña no se conoce aun, pero al parecer ella permite la flotabilidad de las subunidades grandes, las que en ausencia de las subunidades pequeñas tienden a precipitar. En todo caso las subunidades grandes no son activas en ausencia de las subunidades pequeñas. En la reconstitución *in vitro* que se hace de la enzima despojada de sus subunidades pequeñas, la actividad de las subunidades grandes aumenta proporcionalmente al número de subunidades pequeñas cuando a las subunidades grandes se le agregan las pequeñas de una a una (Andrews y col. 1986).



**Fig. 9.** Modelo de la enzima Rubisco. La figura muestra un modelo tridimensional de la enzima vista desde arriba. Se puede apreciar que las 8 subunidades grandes rodean a 4 de las subunidades pequeñas. Las otras 4 subunidades pequeñas están debajo de las otras cuatro y no son visibles en el dibujo de este modelo. El sitio catalítico se encuentra en las subunidades grandes.

Como la mayoría de las moléculas que están en el cloroplasto, la Rubisco tiene un origen bipartito. Es decir los genes que codifican a las subunidades grandes están en el genoma del cloroplasto, en cambio los genes que codifican a la subunidades pequeñas están en el genoma nuclear. Esto significa que la subunidad pequeña se sintetiza en el RE rugoso, en los ribosomas 80S del citoplasma, y debe atravesar el envoltorio del cloroplasto y en el interior de éste ensamblarse con las subunidades grandes. Para el reconocimiento de su sitio de destinación la subunidad pequeña se traduce con péptido señal. Es decir, el gen nuclear que codifica a la subunidad pequeña tiene una secuencia adicional que señala su destinación. Cuando la subunidad pequeña llega a la superficie del cloroplasto, el péptido señal se ancla en el envoltorio del cloroplasto. Allí el péptido señal es cortado por una enzima y la proteína es introducida al interior del cloroplasto. En el cloroplasto, la subunidad pequeña debe ensamblarse con la subunidad grande pero no lo puede hacer sin la ayuda de proteínas chaperonas de 60 KDa que posee el cloroplasto y que ayudan a plegar tanto a la subunidad grande como a la subunidad pequeña. La chaperona también es una molécula cuyos genes codificantes están en el genoma nuclear e igual que la subunidad pequeña se hace en los

ribosomas del citoplasma, emigra al cloroplasto y allí en el estroma cumple su función de conformar a ambas subunidades que se ensamblan constituyendo la enzima activa (Fig. 10).



**Fig. 10.** Ensamblaje de las subunidades grandes y pequeñas de la Rubisco en el interior del cloroplasto. Las subunidades grandes y las subunidades pequeñas de la Rubisco deben ensamblarse en el interior del cloroplasto para que la enzima sea activa. Mientras la subunidad grande está codificada en el genoma del cloroplasto, el gen para la subunidad pequeña está codificado en el genoma nuclear. Este gen nuclear, como se observa en la figura, se transcribe en el núcleo y el mRNA es traducido en los ribosomas del citoplasma. La proteína es conducida al cloroplasto por un péptido señal que se corta en el envoltorio del cloroplasto cuando el péptido es transportado al interior del cloroplasto. Una chaperona del cloroplasto ayuda a ensamblar a la subunidad grande y pequeña otorgándoles la configuración apropiada. C: cloroplasto, N: núcleo.

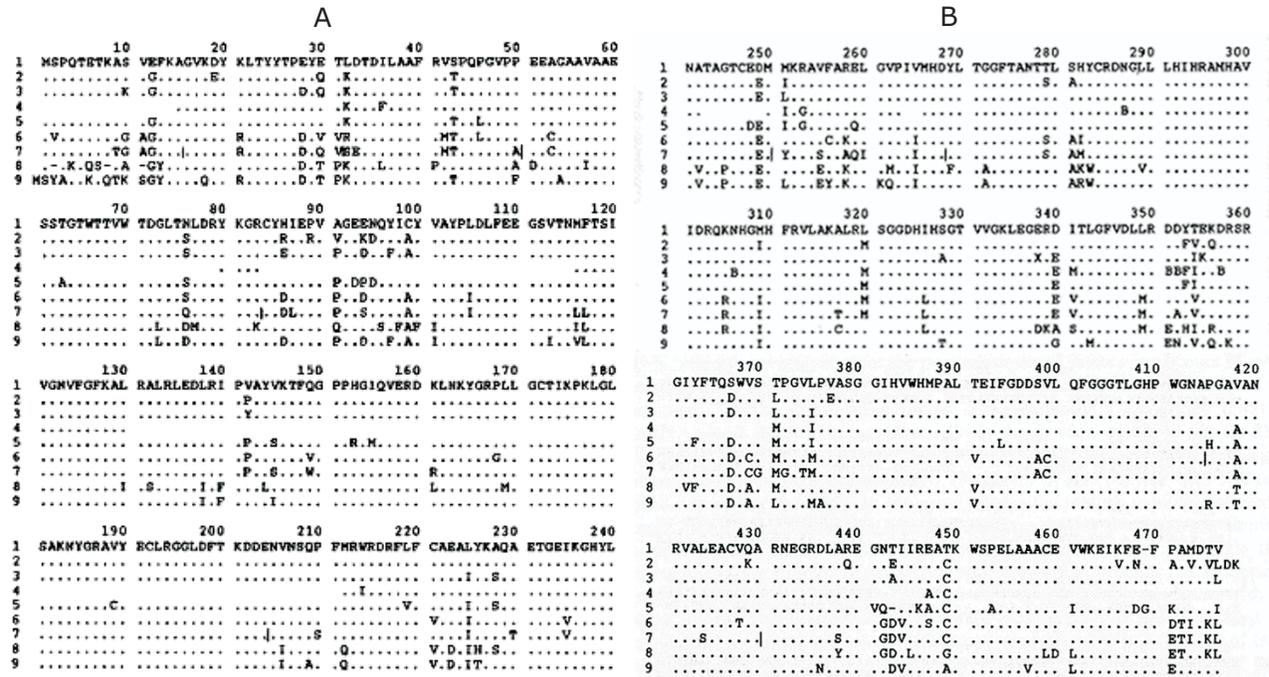
### La Rubisco es una enzima muy antigua y con muchos años de evolución

La Rubisco data desde que en la tierra se estableció la atmósfera de  $O_2$ . Es decir, existe desde el Precámbrico, hace unos 4.000 millones de años atrás. Una pregunta válida de formular es ¿cuánto ha evolucionado la Rubisco desde esa época a la fecha?, o mejor aún ¿cuántos cambios ha soportado la molécula de esta enzima a través de millones de años de su existencia en la tierra? Estudios de la secuencia de la proteína de la subunidad grande (Fig. 11) y de la subunidad pequeña (Fig. 12) comparando las secuencias en cianobacterias y diferentes plantas vasculares, entre otras espinaca, revelan que a pesar del tiempo que separa a ambos grupos, existen muy pocas mutaciones. En el caso de la subunidad grande podemos observar un alto grado de conservación en la secuencia proteica. En la subunidad pequeña hay más cambios, pero recordemos que el sitio activo y la regulación de la enzima ocurren en la subunidad grande. Quizás las partes conservadas de la subunidad pequeña son aquellas relacionadas a las zonas de unión de esta subunidad con la subunidad grande.

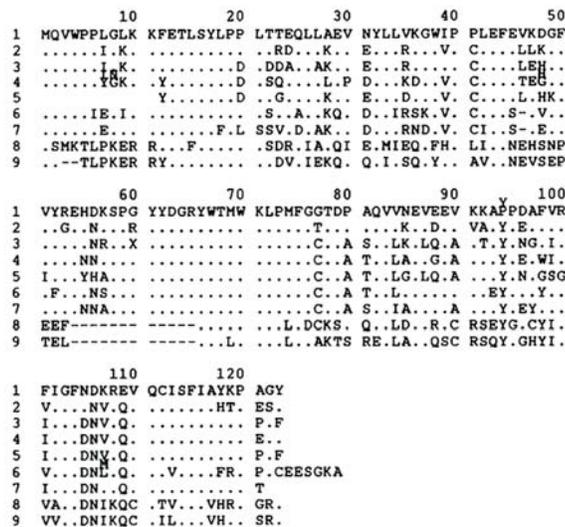
### La Rubisco es una oxigenasa que en las horas del día de mayor radiación solar funciona como oxigenasa y no como carboxilasa

Muy pronto después que el Ciclo de Calvin-Benson fue conocido como la vía metabólica por la cual las plantas asimilaban  $CO_2$ , comenzaron las críticas a este descubrimiento. Las críticas llegaron desde el sector agrícola, porque los rendimientos que los agricultores obtenían en sus cultivos era muy inferior a los cálculos teóricos que se hacían del rendimiento de un cultivo considerando que el Ciclo de Calvin-Benson funcionaba durante todas las horas de luz del día. Los detractores culpaban a Calvin y su grupo de realizar sus experimentos con un alga unicelular que tenía poco o nada de relación con las plantas que los agricultores sembraban en sus campos.

Sin embargo, muy pronto se descubrió que las plantas no tenían el rendimiento teórico calculado



**Fig. 11.** Secuencia aminoacídica de la subunidad grande de la Rubisco. La secuencia de aminoácidos de toda la subunidad grande se compara en 9 especies de plantas. 1) espinaca, 2) tabaco, 3) arveja, 4) cebada, 5) maíz, 6) *Chamydomonas reinhardtii*, 7) *Euglena gracilis*, 8) *Synechococcus* PCC 6301, 9) *Anabaena* PCC 7120. Cada punto denota identidad con los aminoácidos de la secuencia 1 que corresponde a espinaca. A, corresponde a la secuencia de los primeros 240 aminoácidos. B, corresponde a la secuencia de los otros 236 aminoácidos (adaptado de The Biochemistry of Plantas, vol. 10).

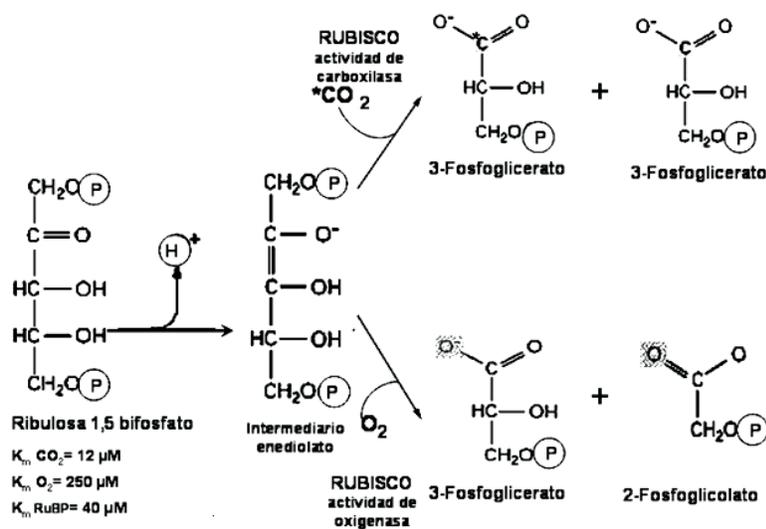


**Fig. 12.** Secuencia aminoacídica de la subunidad pequeña de la Rubisco. La secuencia de aminoácidos de toda la subunidad pequeña se compara en 9 especies de plantas. 1) espinaca, 2) arveja, 3) soya, 4) tabaco, 5) petunia, 6) trigo, 7) *Lemna gibba*, 8) *Synechococcus* PCC 6301, 9) *Anabaena* PCC 7120. Cada punto denota identidad con los aminoácidos de la secuencia 1 que corresponde a espinaca (adaptado de The Biochemistry of Plantas, vol. 10).

por el Ciclo del Calvin-Benson, porque a horas de mayor radiación solar, que coinciden con las horas de mayor temperaturas del día, las plantas no asimilaban CO<sub>2</sub> del todo. Las plantas a esta hora fotorrespiran, es decir en vez de asimilar CO<sub>2</sub> ellas asimilan O<sub>2</sub> oxidando a la 1,5 RuBP, entregando una molécula de 2-fosfoglicolato y una molécula de 3-PGA. Como en el Ciclo de Calvin-Benson son

dos las moléculas de 3-PGA, indudablemente, el rendimiento de las plantas se reduce en esas horas del día a la mitad del rendimiento teórico. La razón de esta actividad oxidativa se debe a la Rubisco, que tiene también actividad de oxigenasa, además de actividad de carboxilasa.

La pregunta que surge es ¿por qué a estas horas del día la Rubisco actúa como oxigenasa y no como carboxilasa? Dos factores pueden ayudar a explicar la pérdida de eficiencia del ciclo de Calvin-Benson por fotorrespiración (Fig. 13). Por un lado, a pesar que la Rubisco tiene mucha más afinidad por el  $\text{CO}_2$  ( $K_m = 12 \mu\text{M}$ ) que por el  $\text{O}_2$  ( $K_m = 250 \mu\text{M}$ ), a altas temperaturas, el  $\text{CO}_2$  es menos soluble que el  $\text{O}_2$  y por lo mismo, es fácil que la concentración de  $\text{O}_2$  sobrepase el  $K_m$  de la enzima. Por otro lado, a las horas de mayor calor los estomas se cierran impidiendo la entrada de  $\text{CO}_2$ , mientras que en las cavidades subestomáticas sigue aumentando la concentración de  $\text{O}_2$  que es un producto de la fotólisis del agua en el Fotosistema II. Así, mientras la concentración de  $\text{CO}_2$  interno disminuye (por consumo de la Rubisco) y se reduce su solubilidad, la concentración de  $\text{O}_2$  aumenta ya que éste no puede salir de las cavidades subestomáticas y es un gas mas soluble que el  $\text{CO}_2$ .



**Fig. 13.** La doble actividad de la enzima Rubisco. La Rubisco también puede actuar como oxigenasa a las horas del día en que aumenta la radiación solar y la temperatura. Como oxigenasa la enzima oxida el sustrato: 1,5- RuBP en vez de carboxilarlo. La figura muestra además los  $K_m$  de la enzima para el  $\text{CO}_2$ , para el  $\text{O}_2$  y para la 1,5-RuBP. Como oxigenasa, la Rubisco sintetiza una sola molécula de 3-PGA que entra en el ciclo de Calvin y una molécula de 2-fosfoglicolato. Este último sigue la vía de la fotorrespiración.

La vía metabólica de la fotorrespiración en plantas fue estudiada por Edward Tolbert (Lorimer y col. 1981), quien a su vez había trabajado con Calvin en las investigaciones del Ciclo de Calvin-Benson. Tolbert determinó todas las reacciones de la fotorrespiración y las enzimas que catalizan cada una de estas reacciones. También logró demostrar que en la fotorrespiración participan tres organelos de la célula del mesófilo: el cloroplasto, los peroxisomas y las mitocondrias.

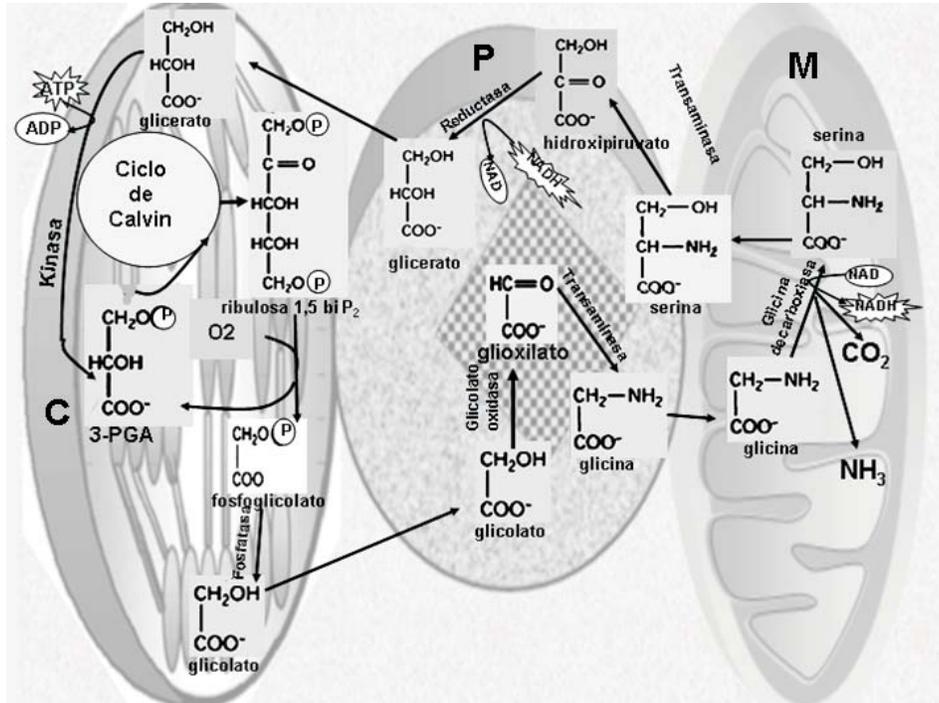
En el cloroplasto, la fotorrespiración implica la oxidación de la 1,5 RuBP produciéndose una molécula de 3-PGA y una de ácido 2 fosfoglicólico. El ácido 2 fosfoglicólico se defosforila por acción de una fosfatasa y se transporta al peroxisoma.

En el peroxisoma ocurre la oxidación del glicolato. Esta oxidación es catalizada por una enzima: la glicolato oxidasa. En esta reacción el glicolato se oxida a glioxilato. Este glioxilato a continuación se transamina en el mismo peroxisoma por acción de una glutamato transaminasa originando glicina y ácido - ketoglutarico.

La glicina se transporta a la mitocondria donde un complejo enzimático que tiene al tetrahidrofolato como co-factor, sintetiza serina a partir de dos moléculas de glicina, liberando  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ . La serina

posteriormente se transporta al peroxisoma.

En el peroxisoma, la serina es tomada por una transaminasa que transfiere el grupo amino al ácido - ketoglutarico formando glutamato e hidroxipiruvato que es reducido a ácido glicérico por acción de una  $NAD^+$  reductasa. El ácido glicérico puede seguir a la síntesis de varios compuestos, entre otros ir a la síntesis de lípidos (Fig. 14).



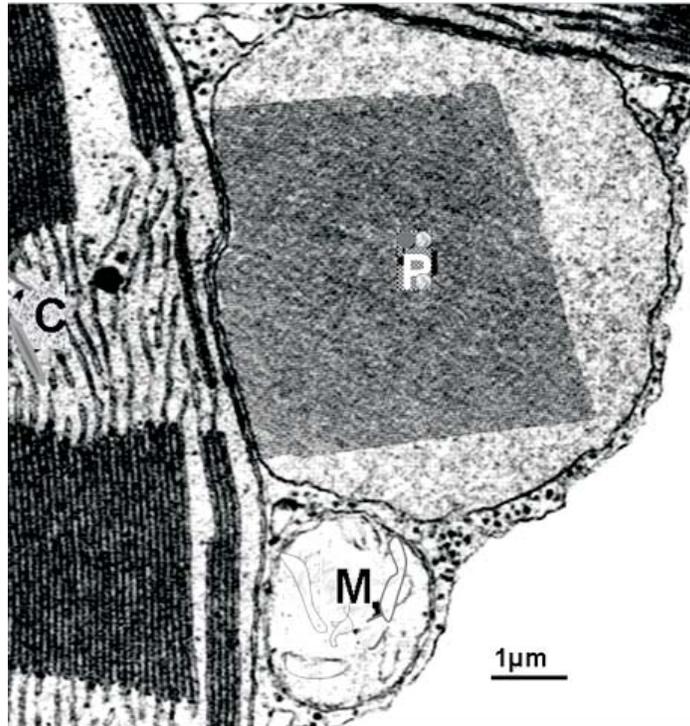
**Fig. 14.** Reacciones de la fotorespiración. Cuando la RUBISCO actúa como oxigenasa, uno de los productos de la oxidación de la 1,5 RuBP es el 2fosfoglicolato. Este compuesto después de ser defosforilado por acción de una fosfatasa, sale del cloroplasto y entra en el peroxisoma donde es oxidado a glioxilato por la glicolato oxidasa. En el peroxisoma el glioxilato es aminado por acción de una transaminasa formando glicina. La glicina es transportada a la mitocondria donde en una reacción muy compleja dos moléculas de glicina constituyen una molécula de serina, con producción de CO<sub>2</sub> y amoníaco. Estas reacciones en que participan estos tres organelos constituyen la fotorespiración y ocurre en las plantas C<sub>3</sub>. C: cloroplasto, P: peroxisoma, M: mitocondria.

En resumen, en la fotorrespiración, el cloroplasto de la hoja toma O<sub>2</sub> y la mitocondria libera CO<sub>2</sub>, como en el caso de la respiración mitocondrial. De ahí el nombre de fotorrespiración, ya que las enzimas son activadas por la luz y ocurre en las horas del día de mayor radiación solar.

A Edward Tolbert no le fue fácil convencer a los científicos de su tiempo para aceptar la vía de las reacciones de la fotorrespiración. La crítica principal era que la vía aparecía muy compleja y que la proposición de la participación de los tres organelos: cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias era improbable, ya que en ese entonces no se conocían metabolitos que se transportaran desde un organelo a otro. Tolbert siendo bioquímico realizó estudios celulares usando microscopía electrónica y encontró en células del mesófilo de plantas que fotorrespiran, una cercanía anatómica muy estrecha entre estos tres organelos, no observada hasta entonces, tal como se muestra en las Figuras 14 y 15 donde se puede apreciar que los envoltorios de estos organelos están en contacto.

**La vía metabólica de la fotorrespiración evolucionó como una consecuencia de la acumulación de glicolato producto de la actividad de oxigenasa de la Rubisco**

Mucho se ha especulado de la función fisiológica que la fotorrespiración pudiera tener para la planta. Se ha argumentado que la fotorrespiración podría permitir a la planta disponer de



**Fig. 15.** Disposición de tres organelos en una célula del mesófilo de una planta C3. Microfotografía electrónica mostrando la coalescencia de un cloroplasto, una mitocondria y de un peroxisoma en la célula de una hoja de una planta C3. El aumento se muestra al lado basal derecho (archivos Liliana Cardemil). C, cloroplasto, P, peroxisoma y M, mitocondria.

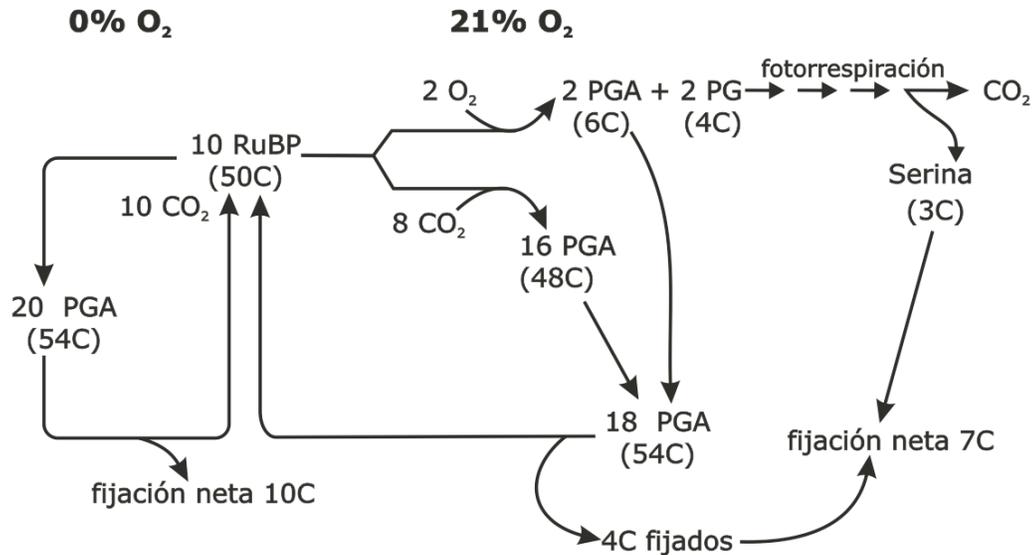
cantidades extra de los aminoácidos como glicina y serina. Esta hipótesis es muy improbable ya que la planta dispone de otras vías de síntesis de estos aminoácidos. Quizás el  $\text{NH}_3$  que se libera en la mitocondria a través del complejo enzimático que descarboxila a la glicina para disponer de un  $\text{CH}_2$  para la síntesis de serina, podría ser beneficioso para la planta, porque este amonio se usa para las reacciones de transaminación de aminoácidos. Por lo tanto, esta utilización del  $\text{NH}_3$  sería una economía de nitrógeno para la planta. Sin embargo, las plantas leguminosas tienen una abundancia de nitrógeno, por lo cual la liberación de  $\text{NH}_3$  no puede justificarse al menos en estas especies.

Más que una función favorable para la planta, Andrews y Lorimer (1987) piensan que esta vía metabólica se originó para deshacerse del glicolato, molécula que se sintetiza por la actividad de oxigenasa de la Rubisco. Sin embargo, gracias a esta vía, es posible recuperar un 75% del carbono perdido con la formación del glicolato (Fig. 16). Otros autores plantean que en las condiciones ambientales en que la Rubisco actúa como oxigenasa (i.e., alta radiación y temperatura que genera un cierre estomático y la bajada de los niveles de  $\text{CO}_2$ ), la existencia de la vía de la fotorrespiración permitiría consumir NADPH y ATP producidos en la fase clara de la fotosíntesis, reduciendo el riesgo de fotoinhibición (ver Capítulo 8).

### **La Rubisco se originó con estas dos actividades hace 4.000 millones de años atrás**

Quizás más que preguntarnos ¿cuál es la utilidad de la fotorrespiración en las plantas?, la pregunta que debiéramos hacernos es ¿por qué la Rubisco evolucionó con estas dos actividades?.

Mucho se ha especulado si la enzima poseía o no estas dos actividades de carboxilasa/oxigenasa cuando la enzima apareció sobre la tierra. Sólo se sabe que la tierra, antes que aparecieran los organismos fotosintetizadores, poseía una atmósfera con una concentración de  $\text{CO}_2$  superior a 3.000 ppm y lo más probable es que en estas condiciones la actividad de oxigenasa de la enzima nunca se manifestó.



**Fig. 16.** Eficiencia fotosintética de una planta C<sub>3</sub>. En ausencia de O<sub>2</sub> (o con 21% de O<sub>2</sub> pero sobre 2.000 ppm de CO<sub>2</sub>) la Rubisco actúa sólo como carboxilasa y el ciclo de Calvin-Benson tiene una eficiencia del 100%. Con una atmósfera con un 21% de O<sub>2</sub> la Rubisco actúa como carboxilasa y oxigenasa. Bajo estas condiciones la eficiencia baja a un 70% del máximo. Note que los 4 átomos de carbono que forman parte de las 2 moléculas de fosfoglicólico (PG) resultantes, se logran recuperar sólo 3 átomos de carbono gracias a la vía de la fotorrespiración.

¿Se puede mutar el gen de la subunidad grande de la Rubisco, de modo que ella tenga solamente actividad de carboxilasa y no de oxigenasa? La verdad es que no existen mutaciones naturales que afecten la actividad de oxigenasa solamente sin afectar a la actividad de carboxilasa y vice versa. Dos investigadores en los años 80, mutagenizaron a *Arabidopsis thaliana* con el objeto de obtener plantas con Rubisco que sólo tuviera actividad de carboxilasa (Somerville y Ogren 1982). Estas mutantes nunca se obtuvieron ya que cualquier cambio en el sitio catalítico parecía afectar a ambas actividades. Los millones de años de existencia de la enzima en la tierra así lo avalan, porque no hay mutantes naturales donde exista una actividad y no la otra. Recordemos que la subunidad grande de la Rubisco es muy conservada a pesar de los 4 mil millones de años que la enzima tiene de existencia.

La actividad de oxigenasa de la enzima comenzó a manifestarse posiblemente cuando la atmósfera cambió su proporción de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> debido al aumento de los productores primarios sobre la tierra.

En la historia de las investigaciones sobre esta enzima, se llegó a concluir que el sitio catalítico de la subunidad grande aloja como sustratos no sólo al CO<sub>2</sub> sino también al O<sub>2</sub>, de manera que el O<sub>2</sub> es un sustrato competidor del CO<sub>2</sub>. Por ser esto así, mutaciones en el sitio catalítico son letales para la planta ya que se afectan ambas actividades.

¿Cómo establecer entonces si el sitio catalítico es el mismo que aloja al CO<sub>2</sub> que el que aloja al O<sub>2</sub>? Fue nuevamente Lorimer y col. (Andersson y col. 1989) en los laboratorios de la Dupont quienes realizaron nuevamente experimentos en que 5 gramos de enzima pura se incubaron ya sea con <sup>17</sup>O<sub>2</sub> o con <sup>11</sup>CO<sub>2</sub> por 20 milisegundos, deteniendo la reacción después de este brevísimo tiempo por denaturación de la enzima. Luego realizaron resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X para observar la unión de cada uno de estos sustratos en el sitio catalítico, encontrando que es el mismo sitio para ambos sustratos. Así se ha deducido la imposibilidad de modificar el sitio catalítico de la subunidad grande de la enzima para eliminar la actividad de oxigenasa.

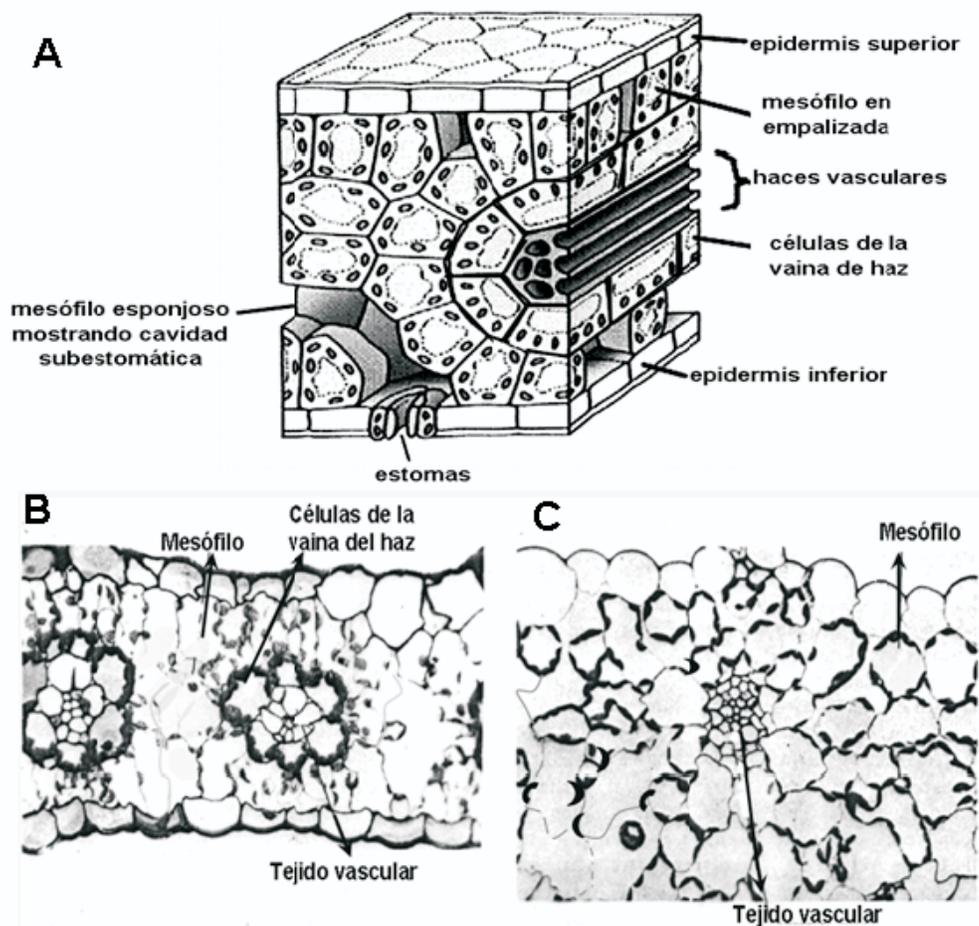
## LAS PLANTAS C4

### Hay plantas que tienen una más eficiente asimilación de CO<sub>2</sub>

Así como llegaron críticas al ciclo de Calvin-Benson porque el rendimiento de ciertos cultivos agrícolas era menor que el teórico calculado si el ciclo funcionaba todas las horas de luz, también aparecieron críticas del sector agrícola de que el ciclo de Calvin-Benson estaba errado porque las plantas de sus cultivos tenían un rendimiento mucho mayor que el calculado teóricamente. Nuevamente se culpó a Calvin y colaboradores de haber usado un alga eucariota unicelular en sus experimentos.

Sin embargo, poco después se descubrió que estas plantas se caracterizan por tener otra vía de asimilación de CO<sub>2</sub>. Estas son plantas adaptadas a climas tropicales en los cuales hay humedad y altas temperaturas. Este es el caso de plantas como la caña de azúcar, maíz, sorgo, panicum y varios pastos tropicales.

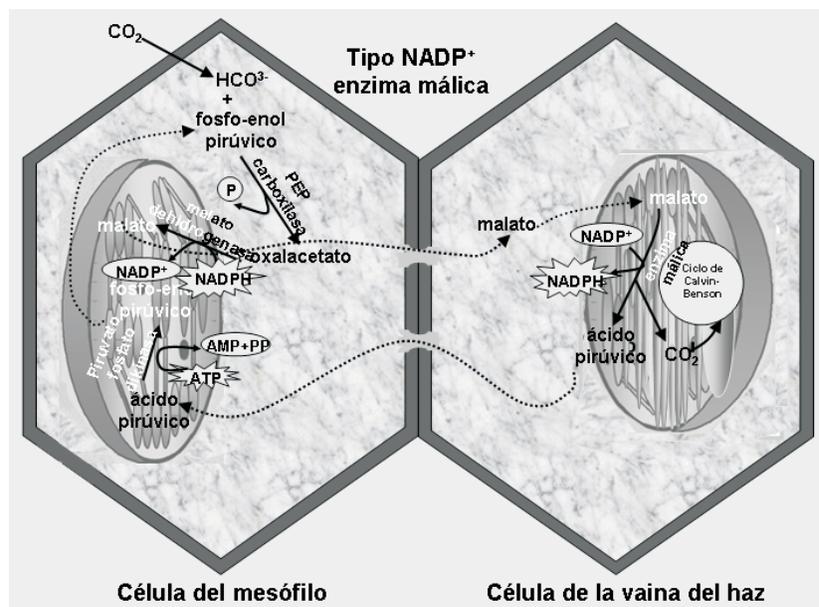
Ellas se caracterizan además por tener hojas con anatomía Kranz, es decir, los vasos conductores de las hojas están rodeados por una capa de células de paredes gruesas que reciben el nombre de "células de la vaina del haz" y que también se conocen como células Kranz (Fig. 17).



**Fig. 17.** Anatomía de la hoja de una planta C4 (anatomía Kranz). La anatomía Kranz tridimensional de una hoja de planta C4 se ilustra en A, donde se puede observar la capa de células de la vaina del haz o células de Kranz rodeando a los haces conductores. B, microfotografía transversal de corte fino de una hoja de maíz (planta C4). C, microfotografía transversal de corte fino de una hoja de trigo (planta C3) (archivos Liliana Cardemil).

Aplicando metodologías similares a las que Calvin usó en su investigación, se descubrió que estas plantas asimilan  $\text{CO}_2$  formando primero compuestos de 4 átomos de carbono y no de 3 átomos de carbono como las plantas que sólo fijan  $\text{CO}_2$  por el ciclo de Calvin-Benson. En efecto, los primeros compuestos sintetizados en las células que constituyen el mesófilo de la hoja son ácidos orgánicos como el ácido oxalacético, ácido aspártico y ácido málico, todos ácidos de 4 átomos de carbono. Recordemos que en el ciclo de Calvin-Benson se sintetiza el 3-PGA, y luego los compuestos 1,3-PGA, 3-GAP y la DHAP, todos compuestos de 3 átomos de carbono. Por esta razón, las plantas que fijan  $\text{CO}_2$  formando compuestos de 4 átomos de carbono, han sido denominadas como plantas C4, en oposición de las plantas que sólo fijan  $\text{CO}_2$  por el Ciclo de Calvin-Benson las que han sido denominadas como plantas C3.

Las plantas C4 tienen una fijación de  $\text{CO}_2$  que comprende dos etapas: la primera fijación de  $\text{CO}_2$  ocurre en las células del mesófilo de la hoja y, la segunda ocurre en las células de la vaina del haz (Fig. 18).



**Fig. 18.** Vía metabólica de la Fijación de  $\text{CO}_2$  en plantas C4-tipo  $\text{NADP}^+$  enzima málica. La figura muestra la vía completa de la fijación de  $\text{CO}_2$  en plantas C4, como es el caso del maíz, comenzando en la célula del mesófilo y continuando en la célula de la vaina del haz. También muestra la compartimentalización de la vía, las reacciones que ocurren en el citoplasma como las que ocurren en el cloroplasto de ambas células.

En las células del mesófilo, la enzima encargada de la primera fijación no es la Rubisco, sino una enzima citoplasmática constituida de sólo una cadena polipeptídica de aproximadamente 50 kDa que es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP-carboxilasa). Esta enzima une el  $\text{CO}_2$  a un sustrato de 3 átomos de carbono que es el ácido fosfoenolpirúvico entregando como producto al ácido oxalacético.

Es importante señalar que la PEP carboxilasa tiene un  $K_m$  por el  $\text{CO}_2$  de  $0,5 \mu\text{M}$ , es decir, de un orden de magnitud menor que la  $K_m$  de la Rubisco y, por lo tanto, tiene una afinidad 10 veces mayor que la que tiene la Rubisco por el  $\text{CO}_2$ ! La PEP carboxilasa además no tiene actividad de oxigenasa. Por lo tanto, las plantas C4 no fotorrespiran.

El ácido oxalacético, primer producto de la reacción de la PEP-carboxilasa que se forma en el citoplasma, se transporta al cloroplasto de esta misma célula donde una enzima la malato dehidrogenasa, transforma al ácido oxalacético en ácido málico. El ácido málico se transporta desde el cloroplasto al citoplasma celular y de ahí a las células de Kranz (o de la vaina del haz) pasando al cloroplasto de esta célula. El ácido oxalacético debe ser transformado puesto que no es

capaz de ingresar directamente a la vaina de haz.

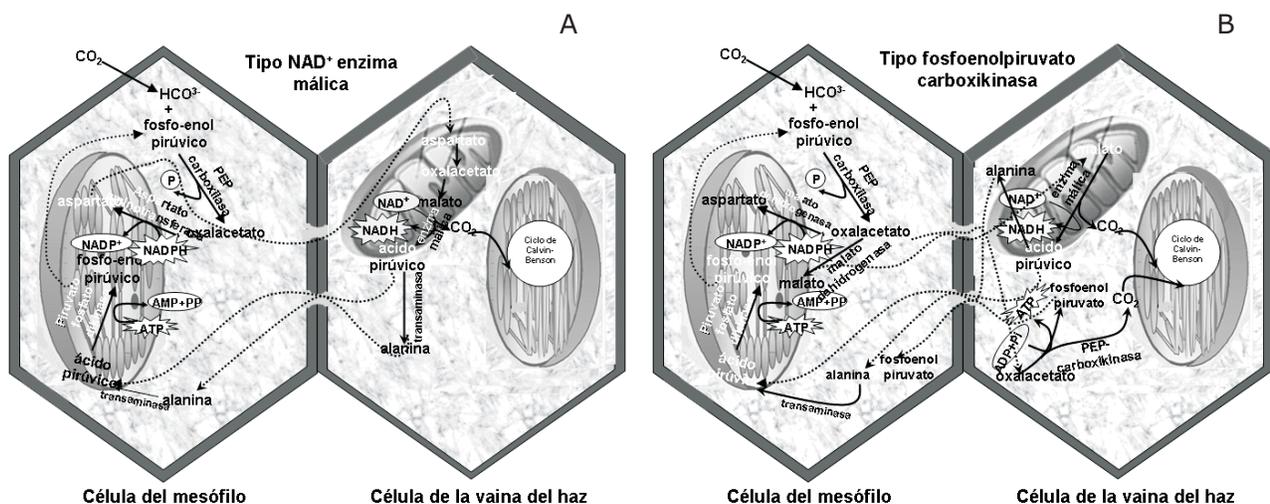
En el cloroplasto de las células de la vaina del haz, otra enzima llamada enzima málica, descompone al ácido málico en  $\text{CO}_2$  y piruvato. El  $\text{CO}_2$  que se produce entra al ciclo de Calvin-Benson en el mismo cloroplasto. Allí origina 2 moléculas de 3-PGA y los típicos compuestos de 3 átomos de carbono necesarios para la síntesis de azúcar a partir de la fructosa-6- fosfato. Esta es la segunda fijación de  $\text{CO}_2$ . Es importante señalar que en el cloroplasto de la célula de Kranz la concentración de oxígeno es baja, porque el  $\text{O}_2$  atmosférico no entra en estas células de paredes gruesas y el cloroplasto no produce  $\text{O}_2$  como producto de la fotólisis del agua ya que carece de Fotosistema II. Este cloroplasto carece de granas que es donde se ubica el Fotosistema II.

El piruvato sale al citoplasma de la célula de la vaina del haz y vuelve a la célula del mesófilo. En esta célula, se transporta al cloroplasto donde una enzima llamada piruvato fosfato dikinasa (PPDK) sintetiza a partir del piruvato al ácido fosfoenolpirúvico recuperando el sustrato de la PEP carboxilasa que es el ácido fosfoenolpirúvico. El ácido fosfoenolpirúvico se transporta al citoplasma celular donde actúa como sustrato de la PEP carboxilasa.

### Existen varias variantes de esta vía de fijación propia de las plantas C4

La asimilación de  $\text{CO}_2$  en plantas es un proceso que puede ser más complejo que el presentado acá. La vía fotosintética C4 se ha encontrado en 18 familias de angiospermas (15 familias de dicotiledóneas y 3 de monocotiledóneas) (Squeo y Ehleringer 2004). En términos de biomasa y número de especies, es mucho más importante dentro de las monocotiledóneas. La mitad de las especies de gramíneas son C4. Puesto que la evolución de las plantas C4 ocurrió en forma convergente en estos diversos grupos de plantas, existen varias respuestas evolutivas alternativas entre plantas C4. En general se distinguen tres clases de fijación de  $\text{CO}_2$  tipo C4:

- La asimilación tipo "enzima málica-NADP<sup>+</sup>" que es la que presentan el maíz y la caña de azúcar (Fig. 18).
- La asimilación tipo "NAD<sup>+</sup>-enzima málica" que presenta sorgo (Fig. 19A).
- La asimilación tipo "fosfoenolpiruvato carboxikinasa" que presenta *Panicum maximum* (Fig. 19B)



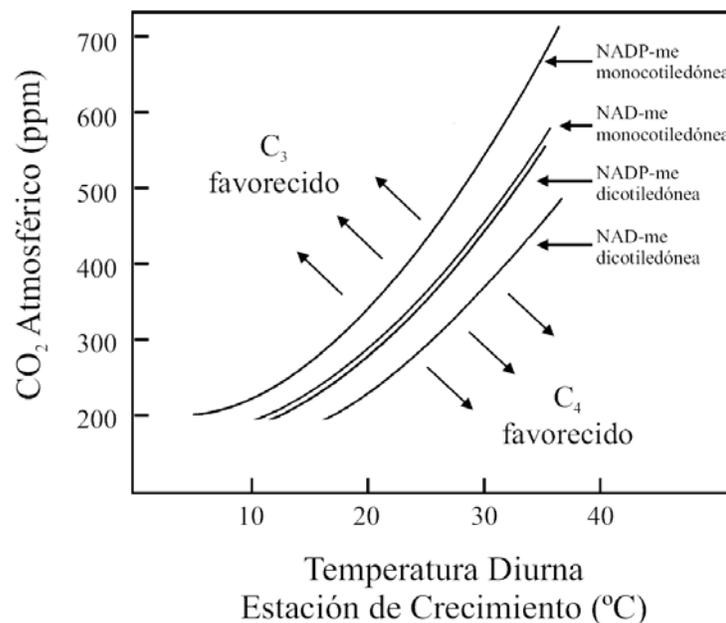
**Fig. 19.** Variaciones de la vía de fijación de  $\text{CO}_2$  en plantas C4. La figura muestra la vía de fijación de  $\text{CO}_2$  tipo NAD<sup>+</sup> enzima málica en A y tipo fosfoenolpiruvato carboxikinasa en B. Como en el caso de la figura 17, la figura muestra el comienzo de la vía en la célula del mesófilo y su continuación en la célula de la vaina del haz. También muestra las reacciones que ocurren en cada compartimento: citoplasma, cloroplastos de ambas células y mitocondria.

Tanto en la "tipo NAD<sup>+</sup>-enzima málica" como en el caso "tipo fosfoenolpiruvato carboxikinasa", participa también la mitocondria. En ambas vías el segundo producto no es ácido málico sino ácido aspártico (de 4 átomos de C) y es éste el ácido que se moviliza a las células de Krantz. Además, en ambas vías, gran parte del ácido pirúvico que se sintetiza en el cloroplasto de la célula de la vaina del haz, vuelve a la célula del mesófilo como ácido fosfoenolpirúvico o alanina. En esta célula, la alanina vuelve a formar ácido pirúvico gracias a una transaminasa que genera ácido glutámico a partir del ácido -ketoglutámico.

### Las plantas C4 tienen diferente óptimo de temperatura comparado a las C3.

La temperatura óptima para la fotosíntesis en las plantas C4 se encuentra entre los 30 y 40°C, lo que explica su dominancia en ecosistemas tropicales y su fuerte presencia en ambientes desérticos con lluvia de verano. En este último caso, el agua está disponible cuando la temperatura supera los 30°C. En el caso de los desiertos con lluvia de invierno (como es el caso del norte-centro de Chile), las plantas C4 son relativamente escasas. La diferencia en la temperatura óptima está dada por la PEP-carboxilasa.

En general, a mayor temperatura y menor concentración de CO<sub>2</sub> las plantas C4 están favorecidas respecto a las C3. La situación se invierte a temperaturas más bajas y menores concentraciones de CO<sub>2</sub>. La productividad cuántica de asimilación de CO<sub>2</sub> entre los distintos tipos de plantas C4 también difieren entre ellas (Fig. 20).



**Fig. 20.** Productividad cuántica de asimilación de CO<sub>2</sub> para monocotiledóneas y dicotiledóneas como una función de la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico. Las condiciones límite, tanto para las plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, son los grupos C4 NADP-me (borde superior) y C4 NAD-me (borde inferior). Las curvas representan la temperatura de reemplazo de las especies C3 por cada tipo de planta C4. La temperatura de reemplazo es definida como la temperatura (para una particular concentración de CO<sub>2</sub>) donde la productividad cuántica de asimilación de CO<sub>2</sub> es equivalente para las plantas C3 y C4 (Squeo & Ehleringer 2004).

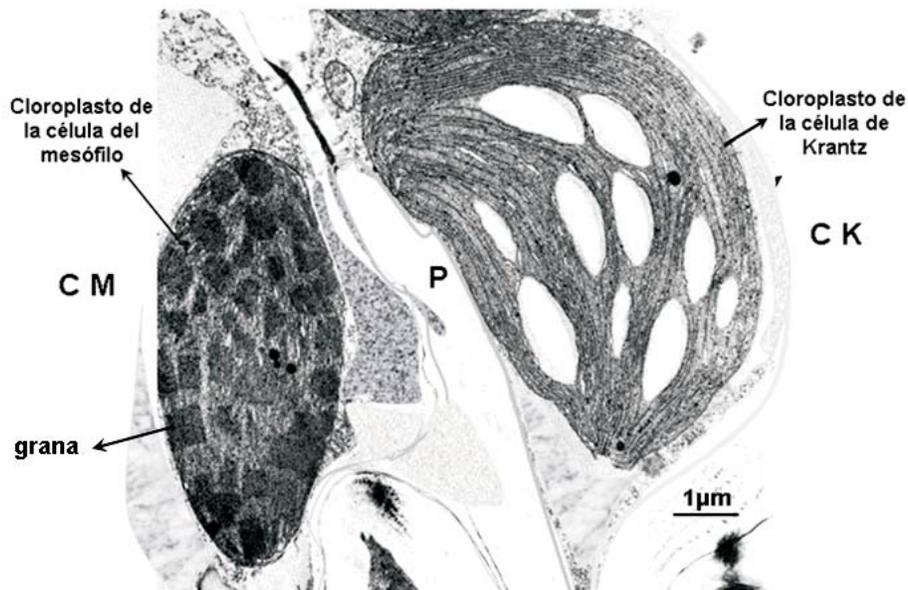
### Las plantas C4 son muy eficientes en la asimilación del CO<sub>2</sub>

Las Figuras 17 y 18 muestran que en todas las variantes de la asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas C4, el compuesto de 4 átomos de carbono, que viaja desde las células del mesófilo a las células de Krantz, ya sea como ácido málico o ácido aspártico, vuelve a originar un compuesto de 3 átomos de carbono y CO<sub>2</sub> en las células de la vaina del haz. Este compuesto puede ser ácido pirúvico o ácido

fosfoenolpirúvico o alanina. El  $\text{CO}_2$  es asimilado por el ciclo Calvin-Benson, es decir el  $\text{CO}_2$  es tomado por la Rubisco junto con la 1,5 RuBP para formar dos moléculas de 3-PGA.

La innovación que presentan las plantas C4 respecto a las C3, es que en las células de Krantz, el  $\text{CO}_2$  no compite nunca con el  $\text{O}_2$ , ya que estas células tienen paredes gruesas y están aisladas de las cavidades del mesófilo. Este sello impide la entrada de  $\text{O}_2$  desde el mesófilo esponjoso, junto con reducir la salida de  $\text{CO}_2$ . Los cloroplastos de ellas son distintos y no tienen fotosistema II, por lo tanto no hay generación de  $\text{O}_2$ , producto de la fotólisis del agua. Ya hemos discutido sobre el origen convergente de metabolismo C4 en distintos grupos de especies. Esta diferencia se nota también en el grosor y aislamiento de las células de Krantz, el cual se refleja en su eficiencia fotosintética.

Es interesante estudiar la anatomía de los cloroplastos de las células Krantz y comparar su estructura con la de los cloroplastos de las células del mesófilo. Ellos son muy distintos a los cloroplastos de las células del mesófilo y sin embargo, ¡están en la misma hoja!. En los cloroplastos de las células de Krantz no hay granas como en los cloroplastos de las células del mesófilo, sólo tienen intergranas, lo que significa que en estos cloroplastos prácticamente no hay Fotosistema II y por lo tanto, no hay evolución de  $\text{O}_2$  como producto de la fotólisis del agua. Así, en los cloroplastos de estas células, la Rubisco sólo actuará como carboxilasa y todo el  $\text{CO}_2$  que en estas células se produce, se vuelve a fijar por el ciclo Calvin-Benson (Fig. 21).



**Fig. 21.** Cloroplastos dimórficos de hojas de plantas C4. Microfotografía electrónica que muestra la diferente estructura que tienen los cloroplastos de las células del mesófilo de maíz (con granas) y de las células de Krantz (sin granas). C M, célula del mesófilo. C K, célula de Krantz. P, es la pared celular que separa a ambas células (archivos Liliana Cardemil).

Las células del mesófilo, en cambio, tienen cloroplastos típicos de las hojas de cualquier angiosperma. Tienen granas e intergranas, y por lo tanto tienen Fotosistemas I y II. En estos cloroplastos la subunidad grande de la Rubisco, que es la que tiene el sitio catalítico, no está presente. La subunidad pequeña se sintetiza en el citoplasma se acumula en los cloroplastos sin encontrar a la subunidad grande (Fig. 21). En estas células tampoco hay fotorrespiración porque la subunidad catalítica de Rubisco no existe.

**Resumiendo:** Los cloroplastos de las células del mesófilo de las plantas C4 tienen granas con Fotosistemas I y II, pero no tienen Rubisco funcional porque no sintetizan la subunidad grande; los

cloroplastos de las células Krantz, no tienen granas y no tienen Fotosistema II, pero tienen Rubisco ya que ellos sintetizan la subunidad catalítica de esta enzima.

En las plantas C4 todo favorece la asimilación del CO<sub>2</sub>. La primera fijación del CO<sub>2</sub> ocurre por la PEP-carboxilasa que tiene una afinidad mayor por el CO<sub>2</sub> que la afinidad que posee la Rubisco por este sustrato y no tiene actividad de oxigenasa. La segunda fijación ocurre en las células de Krantz, células de paredes gruesas, sin Fotosistema II y con baja concentración de O<sub>2</sub>. Por lo tanto, en estas células no hay fotorrespiración.

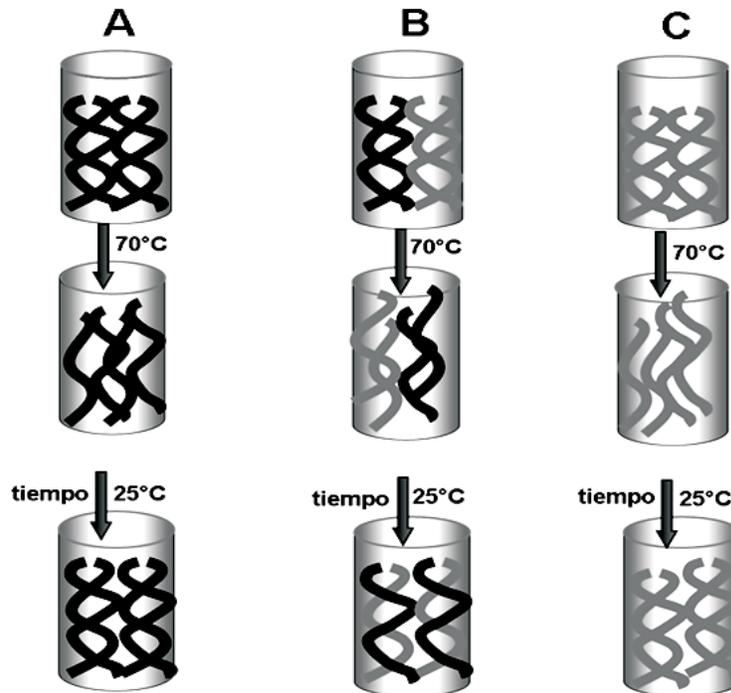
Las plantas C4 se expandieron en la tierra en un momento cuando el CO<sub>2</sub> de la atmósfera disminuyó considerablemente. Efectivamente, por estudios de isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en sedimentos orgánicos y en dientes de animales fósiles, se ha estimado que las plantas C4 aparecieron en la tierra 12 millones de años atrás, pero se expandieron considerablemente entre 6-8 millones de años atrás, coincidiendo con una disminución de la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico. Esta presión selectiva ambiental favoreció la evolución convergente del metabolismo C4 en especies de diversos grupos taxonómicos, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

### **Los cloroplastos de las células del mesófilo y los cloroplastos de las células de Krantz, ¿tienen igual o distintos genomas?**

El análisis anterior nos lleva a formular la pregunta si los cloroplastos de las células del mesófilo y los cloroplastos de las células de Krantz, tienen igual o distintos genomas. Recordemos que los centros de reacción de los Fotosistemas I y II están en parte codificados por genes ubicados en el genoma del cloroplasto y en parte por genes codificados en el genoma nuclear. Así, la subunidades D1 y D2 del centro de reacción del Fotosistema II son codificadas por genes cloroplásticos. La subunidad grande la Rubisco está también codificada por un gen del genoma del cloroplasto. De manera que si faltan las proteínas D1 y D2 del Fotosistema II en los cloroplastos de las células de Krantz su ausencia podría deberse a la falta de estos genes en el genoma de estos cloroplastos o a la falta de expresión de estos genes en el cloroplasto de estas células. A la inversa, si en las células del mesófilo la subunidad grande de la Rubisco no está, esto podría deberse a la ausencia de este gen en el genoma de los cloroplastos de las células del mesófilo o a la falta de expresión del gen que codifica a la subunidad grande de la Rubisco de esos cloroplastos. Esta pregunta no es trivial, porque de ser así sería muy difícil explicar el origen de los cloroplastos por la teoría endosimbiótica.

Para poder contestar esta pregunta años atrás Virginia Walbot (1971) decidió realizar el siguiente experimento usando cloroplastos aislados de las células de Krantz y de las células del mesófilo de la planta *Panicum maximum*, una gramínea C4. En 1971, los genomas de los cloroplastos no estaban aún secuenciados. En el experimento (Fig. 22), ella aisló los ADNs genómicos de ambos cloroplastos y los sometió a temperaturas de 70°C, temperatura a la cual el ADN se denatura (la doble hélice se desenrolla). Luego, bajó la temperatura con el objeto de medir la cinética de reasociación, ya que las hebras de ADN volverán a formar la doble hélice en un tiempo muy rápido cuando estas hebras son totalmente complementarias. Si los ADNs de estos cloroplastos tienen igual genoma, ambos ADNs mezclados en igual proporción, sometidos a la temperatura de 70°C y luego enfriados deberán formar la doble hélice a la misma velocidad que lo hace cada molécula de ADN de cada cloroplasto por separado. De modo contrario, si los ADNs de ambos cloroplastos son diferentes, la cinética de formación de doble hélice híbrida será más lenta. Ella encontró que la cinética de reasociación era la misma tanto para las moléculas híbridas de ADN como para las moléculas de ADN de cada cloroplasto por separado. Es decir, ambos cloroplastos tienen idénticos genomas.

Esto llevó a concluir que la diferencia entre ambos cloroplastos es de expresión de los genes que codifican a estas proteínas, es decir, la subunidad grande la Rubisco se expresa sólo en los cloroplastos de las células de la vaina del haz, porque ahí existen condiciones que permiten que los factores transcripcionales del gen estén presentes y que el gen se transcriba. En cambio, los genes



**Fig. 22.** Experimento de Virginia Walbot para determinar si los cloroplastos dimórficos de *Panicum maximum* tienen igual o diferente genoma. Se extrajo el ADN de los cloroplastos de las células del mesófilo y de las células de la vaina del haz, fueron tratados a 70°C y luego enfriados. Posteriormente se midió el tiempo de anilación usando ADN sólo de un tipo de cloroplasto ( A y C), o mezclas de partes iguales de ambos tipos de ADN (B).

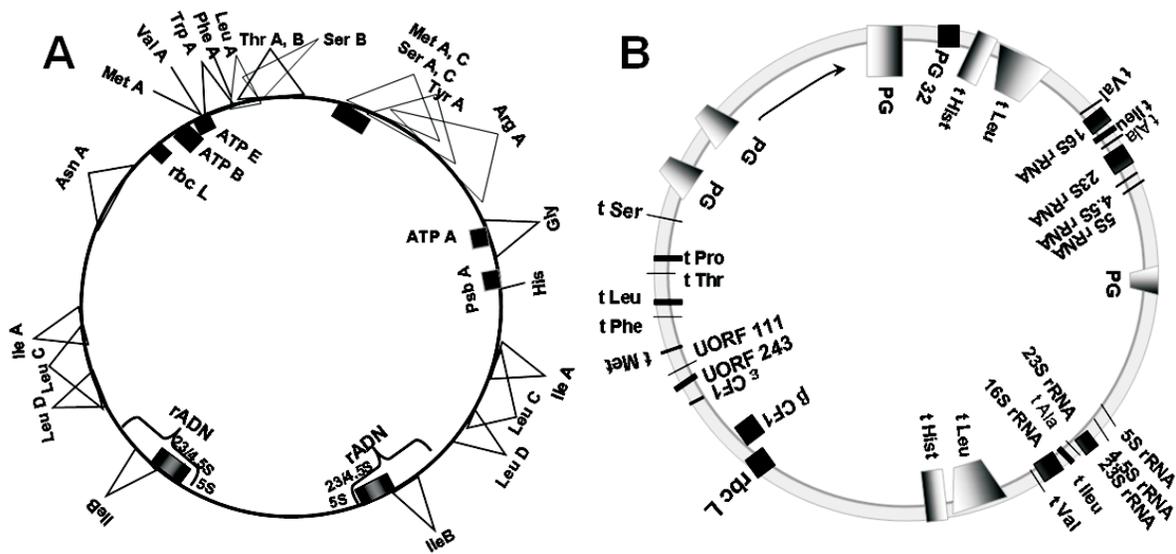
para las proteínas D1 y D2 del Fotosistema II no se transcriben en los cloroplastos de esta célula. En los cloroplastos de las células del mesófilo en cambio, el gen para la subunidad catalítica de la Rubisco no se transcribe, pero si lo hacen los genes que codifican a las proteínas D1 y D2 del Fotosistema II.

¿Hay entonces zonas reguladoras en la secuencias de estos genes? Para contestar esta pregunta debemos estudiar y comparar las secuencias de los genomas cloroplásticos de las plantas C4 y de las plantas C3. La Figura 23 muestra el genoma del cloroplasto de espinaca una típica planta C3 y el genoma del cloroplasto de maíz, una planta C4. Se puede apreciar que ambos genomas son muy parecidos. En ellos hay extensas regiones de secuencias repetidas invertidas con genes que codifican para los ARNs de transferencia para diferentes aminoácidos. Pero más que el estudio de los genomas de ambos cloroplastos, es importante estudiar las secuencias génicas de los genes que codifican para la subunidad grande de la Rubisco de una planta C3 como es espinaca y de una planta C4 como es maíz.

En la Figura 24 podemos ver dos secuencias parciales de la subunidad grande de la Rubisco, la de espinaca y la de maíz, que como sabemos, está codificada por un gen ubicado en el genoma del cloroplasto. La figura muestra la comparación de una región homóloga del gen de maíz con el gen de espinaca. En maíz hay secuencias no presentes en el gen de espinaca y que posiblemente tienen que ver con la regulación de la expresión de esta subunidad en la hoja de maíz.

### **La PEP-carboxilasa y la PPK de las plantas C4 se activan a la luz por dos mecanismos diferentes**

Ambas enzimas, claves en la asimilación de CO<sub>2</sub> por el metabolismo C4, requieren luz para estar completamente activas, sin embargo se activan por distintos mecanismos. En el caso de la PEP-carboxilasa una quinasa llamada PEP-carboxilasa quinasa, se activa por la luz, fosforilando un residuo de serina a la PEP-carboxilasa con gasto de ATP (Fig. 25A).



**Fig. 23.** Comparación del genoma de un cloroplasto de una planta C3 (A, espinaca) con el genoma de un cloroplastos de una planta C4 (B, maíz). Ambos genomas son muy parecidos, tienen secuencias de genes repetidas-invertidas como aquellas que codifican para los ARN ribosomales y los ARN de transferencia para algunos aminoácidos. Se puede observar también la posición de los genes que codifican para algunas proteínas de ATP sintetasa para la subunidad grande la Rubisco.

**espinaca**  
**CGGTTGGGTTGCGCC-ATAT-ATATGAAAGAGTATACAA-TAATGTGTATTGGCGAATGAAA**  
**CTATAGTAAATTCTATAGG-ATA-GAAC-GTACACAGGG-TGTATACATAAAT-ATGAAA**  
**maíz**

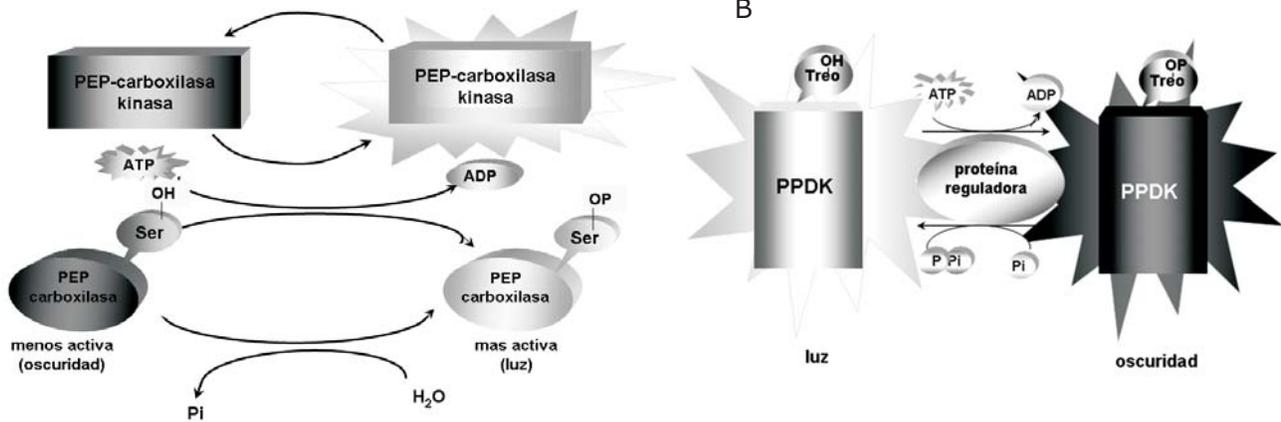
**espinaca**  
**TACATGGTCTATTAAGGAACCAT-----TTTGATTAGTTGATAAT-ATTAATTGAG---**  
**CATATTAC-TTAACTTAAGCATACTCCTTTTTTATTTAATGAGTTGATATTA-ATTAATATC**  
**maíz**

**espinaca**  
**TGATG--AAGATTGCTATAAAAGGTTTCATTAAGGCCTAAT-TATGTCGAGTAGACCTTGTT**  
**ATTTTTT--GATTTTGGAAAGGTTTC-TTC-GCCTAAT-CCTATGGAGTTGTCCCTGT-**  
**maíz**

**espinaca**  
**GCTTTGTTGTAAAAA-TTAAAATTTGAAAGTTGTAGGGAGGGACTTATG** **secuencia regulatoria**  
**GCTTGT-GTGAATTCCTTAATTCATGA-GTTGTAGGGAGGGACTTATG**

**espinaca**  
**TTGCGCcatatatatgaaagagTATACAataatga** **secuencia regulatoria**  
**TTGATAttaattaaTATCATTTTTTAGATTTTTgaaaggtttcttcgcctaa**  
**maíz**

**Fig. 24.** Comparación de una secuencia génica de la subunidad grande de la Rubisco en una planta C3 (espinaca) y de una planta C4 (maíz). En esta secuencia génica que se muestra del gen que codifica para la subunidad grande de la Rubisco, se puede observar que sólo la de maíz presenta regiones reguladoras de la expresión, lo que permite comprender por qué en las plantas C4 este gen se expresa en los cloroplastos de las células de Krantz y no se expresa en los cloroplastos de las células del mesófilo.



**Fig. 25.** Activación indirecta por luz de la PEP-carboxilasa y la piruvato fosfato dikinasa. A, la activación indirecta de la PEP-carboxilasa por la luz ocurre a través de la PEP-carboxilasa kinasa, enzima que se activa por luz, la que con gasto de ATP fosforila a un residuo de serina de la PEP-carboxilasa. En la oscuridad la enzima pierde el grupo fosfato de la serina desactivándose. B, el caso de la piruvato fosfato dikinasa, una proteína reguladora desactiva a la enzima en la noche fosforilando un residuo de treonina. Esta fosforilación hace que la enzima pierda actividad. En el día la misma proteína reguladora defosforila a la piruvato fosfato dikinasa haciéndola activa.

En el caso de la PPDK, existe una enzima reguladora que se activa a la luz, defosforilando a la PPDK en un residuo de treonina para hacerla activa. En la noche en cambio, la PPDK es fosforilada por la enzima reguladora en un residuo de treonina con gasto de ATP, forma que es inactiva (Fig. 25B).

### METABOLISMO ÁCIDO CRASULÁCEO (CAM)

**Las plantas CAM tienen una asimilación de  $\text{CO}_2$  tipo C4, sólo que modificada para el ambiente desértico.**

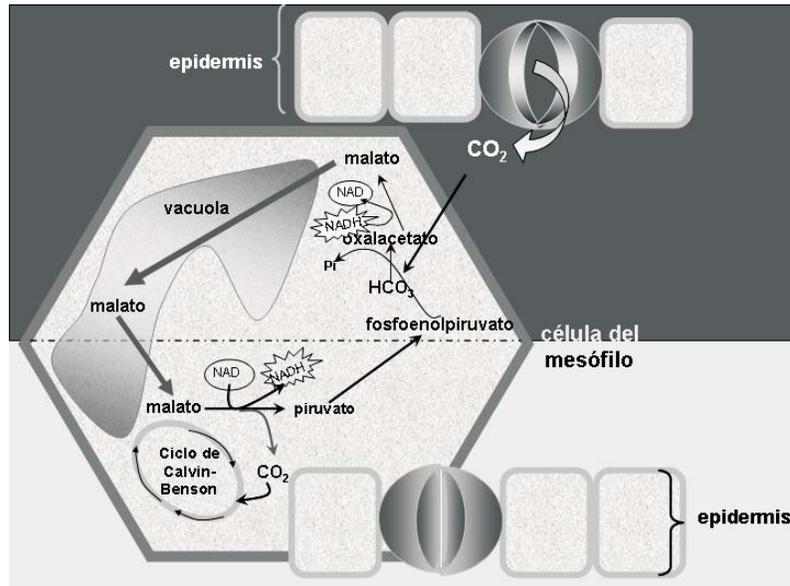
En las plantas suculentas existe un tercer mecanismo de asimilación de  $\text{CO}_2$  denominado metabolismo ácido crasuláceo o conocido también como CAM (crassulacean acid metabolism). A este grupo pertenecen plantas suculentas como las cactáceas, euforbiáceas (por ejemplo, piña), agaves y vainilla. Sin embargo, no todas las plantas suculentas son CAM.

Las plantas CAM se caracterizan por tener una alta eficiencia del uso del agua (i.e., carbono asimilado / agua transpirada) en comparación a las plantas C4 y C3. Para asimilar un gramo de  $\text{CO}_2$ , las plantas CAM gastan sólo 50-100 gramos de agua. En contraste, las plantas C4 y C3 que pierden entre 250-350 y 450-950 gramos de agua por gramo de  $\text{CO}_2$  ganado, respectivamente.

Básicamente, la asimilación de  $\text{CO}_2$  es en estas plantas muy similar a las plantas C4 (Fig. 26). En las plantas CAM, que son plantas adaptadas a ambientes áridos, hay una separación temporal y no espacial de la asimilación tipo C4, a diferencia de las plantas C4 donde hay una separación espacial. Así, en la noche el carbono es fijado por la PEP-carboxilasa, y en el día la asimilación es por el ciclo de Calvin-Benson. Además, en estas plantas hay una gran economía hídrica al mantener los estomas cerrados durante el día y abiertos durante la noche (Capítulo 3).

En la noche, el  $\text{CO}_2$  entra por los estomas y difunde hasta las células del mesófilo donde una PEP-carboxilasa que está activa en la noche, une al  $\text{CO}_2$  con el ácido fosfoenolpirúvico para formar ácido málico. El ácido málico es transportado al interior de la vacuola celular y se almacena durante estas horas. La cantidad de ácido málico almacenado durante la noche es grande y le da a la célula entera un pH ácido, característica que le ha dado el nombre a este metabolismo. En la mañana los estomas se cierran y el ácido málico sale de la vacuola y se transporta al interior de los cloroplastos de estas células. El pH vacuolar vuelve a ser neutro. En el cloroplasto, la enzima málica rompe al malato en

CO<sub>2</sub> y ácido pirúvico. El ácido pirúvico entra en el cloroplasto y la enzima PPKK (piruvato fosfato dikinasa) recupera al ácido fosfoenolpirúvico el cual retorna por glicólisis reversa y es acumulado como almidón, mientras el CO<sub>2</sub> es asimilado por Rubisco entrando al ciclo de Calvin-Benson.



**Fig. 26.** Asimilación del CO<sub>2</sub> por las plantas CAM. El dibujo muestra que la asimilación del CO<sub>2</sub> comienza en la noche con la entrada de CO<sub>2</sub> por los estomas que se encuentran abiertos en la noche evitándose la pérdida de agua. El CO<sub>2</sub> es asimilado por la PEP-carboxilasa que en este caso está activa a esta hora. El malato emigra a la vacuola y se almacena en ella. En el día, la hoja cierra sus estomas y el malato entra al cloroplasto donde la enzima málica lo descompone en ácido pirúvico y CO<sub>2</sub> que ingresa al ciclo de Calvin.

Lo interesante en las plantas CAM, es que las células del mesófilo tienen una PEP-carboxilasa que es activa en la noche. La enzima málica en cambio está activa en el día evitándose así que exista un ciclo fútil. La PEP-carboxilasa es una enzima que existe en dos formas. La forma que se activa en la noche es insensible a concentraciones de malato y se activa por fosforilación de un residuo de serina. En cambio en el día, la PEP-carboxilasa se defosforila. Esta forma defosforilada es inactivada por pequeñas concentraciones de ácido málico. Puesto que este ácido aumenta en el citoplasma en el día, a estas horas la enzima está en su forma inactiva (Fig. 26).

## DESAFÍO BIOTECNOLÓGICO DEL FUTURO

Un desafío a futuro es transformar plantas C<sub>3</sub> en plantas C<sub>4</sub>. Para esto, no es necesario modificar la anatomía de la hoja de la planta. Esto sería muy complejo y en verdad no se necesita tener la sofisticada compartimentalización que tiene maíz o *Panicum maximum*. Tal como se puede apreciar, en el caso de las plantas CAM, no hay dos tipos de células. Todo se realiza en una sola célula, sólo que existe una separación temporal. Por lo tanto, se requiere:

- 1) La planta transformada necesita tener la PEP-carboxilasa expresada en las hojas. Todas las plantas tienen el gen para PEP-carboxilasa, sólo que en las plantas C<sub>3</sub> la enzima no se expresa en las hojas o no se expresa suficientemente. Por lo tanto, el gen que codifica para esta enzima debe ser modificado en las plantas C<sub>3</sub> agregando posiblemente al promotor una caja de expresión para la hoja.
- 2) La enzima malato deshidrogenasa está en todas las plantas. Por lo tanto este gen no es necesario introducirlo en la planta C<sub>3</sub>.
- 3) La otra enzima clave es la enzima málica que no existe en las plantas C<sub>3</sub>. Este gen tiene que introducirse en la planta C<sub>3</sub>.
- 4) Lo mismo debe hacerse con la PPKK, enzima cuyo gen debe de introducirse por ingeniería

genética en las plantas C3.

En estos dos últimos casos, a la secuencia génica de estos genes debe agregárseles las secuencias del péptido señal para que la proteína sea dirigida al cloroplasto de la célula. Parte de este desafío se ha realizado dentro del proyecto genómico de arroz (Edwards y col. 2001).

## RESUMEN

Los estudios de la asimilación de CO<sub>2</sub> atmosférico por las plantas implicaron dilucidar la compleja vía metabólica que realizan los cloroplastos de las células del mesófilo de las hojas, desde el primer compuesto intermediario hasta la síntesis de azúcares. Esto significó para el grupo de científicos dirigidos por Melvin Calvin en los años 50 del siglo XX realizar una serie de experimentos usando el enfoque de pulso y lavado, en que el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (radioactivo) se entregaba, por un brevísimo tiempo, a una monocapa de células de *Chlorella pyrenoidosa*, alga unicelular que posee un solo cloroplasto por célula, para luego lavar el sistema con CO<sub>2</sub> frío. Esto permitió sincronizar el sistema ya que al encender la luz junto con la entrega de CO<sub>2</sub> radioactivo, todas las células de esta monocapa comenzaban la asimilación del CO<sub>2</sub> al mismo tiempo. Los compuestos sintetizados fueron posteriormente analizados por cromatografía bidimensional en papel y detectados por autoradiografía por las manchas dejadas por los compuestos radioactivos.

Así se determinó que el primer compuesto sintetizado era el 3-PGA (ácido 3-fosfoglicérico), que este compuesto es el precursor de la síntesis de sacarosa y que el compuesto que recibe al CO<sub>2</sub> para formar al 3-PGA es la 1,5-RuBP (1,5-ribulosa bifosfato) azúcar de 5 átomos de carbono que se recupera en su totalidad al final del ciclo. En la segunda reacción de la vía, cuando el 3-PGA se transforma en 1,3-PGA (1,3 ácido difosfoglicérico), se gasta ATP y en la tercera reacción cuando el 1,3-PGA se reduce a 3-GAP (3- gliceraldehído fosfato) se gasta NADPH que son los productos obtenidos en las reacciones luminosas del cloroplasto. En la penúltima reacción que es el paso de 5-RuP (5-ribulosafosfato) a 1,5-RuBP (1,5-ribulosa bifosfato) se gasta nuevamente ATP.

La primera enzima que cataliza la unión del CO<sub>2</sub> a la 1,5-RuBP es la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa o Rubisco. La Rubisco es la enzima más abundante de la tierra y está constituida de 8 subunidades grandes y 8 subunidades pequeñas. La subunidad catalítica es la grande, la que está codificada por un gen presente en el genoma del cloroplasto, en cambio las subunidades pequeñas están codificadas por genes presentes en el genoma nuclear. El péptido de la subunidad pequeña es producido en el citoplasma y debe viajar al interior del cloroplasto para luego ensamblarse con la subunidad grande.

La Rubisco es activada por la luz, como el resto de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson. La Rubisco es quizá una de las enzimas más antiguas. Se originó hace 4.000 millones de años atrás cuando la tierra tenía una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> y pobre en O<sub>2</sub>. La Rubisco además tiene actividad de oxigenasa. Por esta razón, las plantas que sólo fijan CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin-Benson fotorrespiran, ya que a las horas de mayor temperatura y mayor radiación solar la enzima oxida a la 1,5- RuBP formando una sola molécula de 3-PGA y otra de dos átomos de carbono el ácido 2-fosfoglicólico. Este proceso reduce el rendimiento de la asimilación del CO<sub>2</sub>. La fotorrespiración es un proceso en que la planta toma O<sub>2</sub> a nivel del cloroplasto y libera CO<sub>2</sub> en la mitocondria, equivalente a lo que sucede en la respiración mitocondrial. En el proceso participan tres organelos, cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias. Las plantas que sólo asimilan CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin-Benson y se denominan plantas C3 porque los primeros compuestos sintetizados por la planta con de 3 átomos de carbono.

Existen otras plantas, las denominadas plantas C4, que se caracterizan por poseer una alta tasa de asimilación del CO<sub>2</sub>. Estas plantas asimilan el CO<sub>2</sub> en dos etapas. Primero, en las células del mesófilo de la hoja, donde en el citoplasma el CO<sub>2</sub> es tomado como sustrato por la enzima denominada PEP-

carboxilasa. La enzima mayor afinidad por el  $\text{CO}_2$  que la Rubisco (i.e., una  $K_m$  de diez veces menor) y no tiene actividad de oxigenasa. La PEP-carboxilasa une el  $\text{CO}_2$  al ácido fosfoenolpirúvico y forma una molécula de 4 átomos de carbono, el ácido oxalacetato, la cual se reduce a ácido málico. Por esta razón se denominan plantas C4. Los cloroplastos de las células del mesófilo carecen de subunidad grande de la Rubisco. En una segunda etapa, el ácido málico emigra a través de los plasmodesmos a las células de la vaina del haz, o células de Kranz. En estas células, el malato entra en los cloroplastos donde la enzima málica descompone al malato en ácido pirúvico y  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  liberado entra al ciclo de Calvin-Benson a través de la reacción catalizada por la Rubisco, sin competencia con el  $\text{O}_2$  ya que en estas células el  $\text{O}_2$  atmosférico no entra por tener paredes gruesas y porque los cloroplastos carecen de granas y por lo tanto de Fotosistema II. De manera que en las plantas C4 no hay fotorrespiración. El ácido pirúvico vuelve a las células del mesófilo donde restituye en los cloroplastos al ácido fosfoenol-pirúvico con gasto de ATP. Del metabolismo C4 hay tres variantes en todas ellas los primeros compuestos sintetizados son de 4 átomos de carbono y de ahí el nombre de plantas C4.

Hay un tercer grupo de plantas que son suculentas, viven en el desierto y se caracterizan por tener una gran economía hídrica. Son las plantas CAM. En ellas existe una asimilación a través de la PEP carboxilasa como en la C4, pero poseen un solo tipo de células. En estas plantas hay una compartimentalización temporal. En la noche, entra el  $\text{CO}_2$  por los estomas (están abiertos) y es asimilado por el metabolismo C4. El ácido málico que se sintetiza se acumula en la vacuola durante la noche. En el día, la planta cierra sus estomas, y el ácido málico sale de la vacuola celular y entra en los cloroplastos. Allí la enzima málica lo descompone en  $\text{CO}_2$  y ácido pirúvico. El  $\text{CO}_2$  entra al ciclo de Calvin-Benson y el ácido pirúvico recupera el ácido fosfoenolpirúvico que por glicólisis reserva vuelve a almidón.

Ha sido imposible modificar la subunidad grande de la Rubisco para que presente sólo actividad de carboxilasa y no de oxigenasa. Esto lo corrobora el hecho que no hay mutantes naturales de la enzima con sólo actividad de carboxilasa. Se llegó así a la conclusión que el sitio catalítico que une al  $\text{CO}_2$  es el mismo que el que une al  $\text{O}_2$ . Hoy existe el consenso que cambios biotecnológicos pueden hacerse por ingeniería genética de las plantas C3 transformándolas en plantas C4.

### **Preguntas.**

- 1.- ¿Por qué las reacciones enzimáticas de la vía que asimila  $\text{CO}_2$  fueron tan difíciles de estudiar en las hojas de las plantas?
- 2.- ¿Cuál fue el enfoque que usó Calvin y su grupo para solucionar los problemas que presenta la estructura de la hoja?
- 3.- ¿Qué experimentos realizó Calvin y su grupo para determinar la secuencia correcta de las reacciones que ocurren desde la primera reacción hasta la formación de azúcar?
- 4.- ¿Cómo se analizaron los productos intermediarios de todas las reacciones enzimáticas?
- 5.- ¿Por qué esta vía constituye un ciclo, llamado Ciclo de Calvin Benson?
- 6.- ¿Cómo ratificó Calvin que el primer compuesto era el 3-PGA?
- 7.- ¿Cómo encontró Calvin que el sustrato que recibe al  $\text{CO}_2$  es la 1,5 RuBP?
- 8.- ¿Dónde se gasta ATP y NADPH en el ciclo?
- 9.- ¿Qué conclusiones se pueden sacar de la estequiometría del ciclo respecto a la cantidad de azúcar que se sintetiza y respecto a la recuperación del sustrato?
- 10.- ¿Qué hace de la Rubisco una enzima tan peculiar y polémica?
- 11.- ¿Cómo es activada la Rubisco por la luz?
- 12.- ¿Cómo son las otras enzimas del ciclo activadas por la luz?
- 13.- Discuta los  $K_m$  de la Rubisco por sus dos sustratos para explicar por qué a ciertas horas del día actúa como oxigenasa y no como carboxilasa.
- 14.- ¿Puede el gen que codifica la subunidad grande de la Rubisco modificarse para tener una

enzima que sólo tenga actividad de carboxilasa y no de oxigenasa?. Discuta su respuesta.

15.- ¿Qué es la fotorrespiración y qué ventaja tiene para las plantas? Discuta

16.- ¿Qué plantas realizan fotorrespiración?

17.- ¿Por qué hay plantas que tienen un rendimiento mayor que el calculado teóricamente por el ciclo de Calvin-Benson incluso si éste funcionara todas las horas de luz?

18.- ¿Cómo se denominan estas plantas? ¿Por qué? Explique.

19.- ¿Qué ventajas anatómicas y bioquímicas tienen estas plantas de mayor rendimiento? Explique y compare con una planta C3.

20.- ¿En qué son distintos los cloroplastos de una célula del mesófilo y de una célula de Kranz en las plantas que tienen mayor rendimiento de asimilación del CO<sub>2</sub>?

21.- ¿Por qué se ha investigado si los cloroplastos de las células del mesófilo y los cloroplastos de las células de Kranz tienen genomas iguales o diferentes?

22.- ¿Cómo son la PEP-carboxilasa y la piruvato fosfato dikinasa activadas por la luz?

23.- ¿Qué son las plantas CAM? Explique.

24.- ¿Qué tipo de asimilación de CO<sub>2</sub> tienen las plantas CAM?

25.- ¿Cómo compatibilizan las plantas CAM la economía hídrica con la asimilación de CO<sub>2</sub>?

26.- ¿Cómo en una planta CAM, la PEP-carboxilasa funciona sólo de noche? Explique.

27.- ¿Cómo se puede transformar una planta C3 en una planta C4? Discuta la pregunta en términos de la ingeniería genética y de la productividad agrícola.

### Lecturas Generales

BUCHANAN BB, GRUISSEM W & JONES RL. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. Capítulo 12.

SALISBURY FB & CW ROSS. 1992. Plant Physiology. 4th. ed. Belmont, CA. Wadsworth. USA. 225 pp.

TAIZ L & ZEIGER E. 2006. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 195 pp.

ANDREWS T. J. & LORIMER G. H. 1987. RUBISCO: Structure Mechanisms and prospects for Improvements. pp, 132. In The Biochemistry of Plants: Volume 10 Photosynthesis. M. D. Boardman & M. K. Hatch: Chapter Editors. Stumpf P. K. and Conn E. E. Editors in Chief. Academic Press.

### Literatura citada

ANDERSSON I., KNIGHT S., SCHNEIDER G., LINDQVIST Y . LUNDQVIST T., BRÄNDÉN C-I. & LORIMER G. H. 1989. Crystal structure of the active site of ribulose-biphosphate carboxylase. NATURE 37: 229-235.

ANDREWS T. J. & LORIMER G. H. 1986. Three partial reactions of ribulose-bisphosphate carboxylase require both large and small subunits. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY: 261: 12184-12188.

BENSON A.A. 1950. The path of carbon in photosynthesis .7. Respiration and photosynthesis. Journal of Experimental Botany 1: 63

EDWARDS G.E., R.T. FURBANK, M.D. HATCH & B.C. OSMOND. 2001. What Does It Take to Be C4? Lessons from the evolution of C4 photosynthesis. Plant Physiology 125: 46-49.

LORIMER G.H, T.J. ANDREWS & N.E. TOLBERT. 1973. Ribulose diphosphate oxygenase.2. Further proof of reaction-products and mechanism of action. Biochemistry 12: 18-23.

MIZIORKO H.M. & G.H. LORIMER. 1983. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase- oxygenase. Ann. Rev. Biochemistry 52: 507-535.

SOMERVILLE C.R. & W.L. OGREN. 1982. Genetic modification of photorespiration. Trends in Biochemical Sciences 7: 171-174.

SQUEO F.A. & J.R. EHLERINGER. 2004. Isótopos estables: una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. En: Cabrera HM (ed) Fisiología Ecológica en Plantas: Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas: 59 - 80. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.