



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**"CARACTERIZACION DE LA ENZIMA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE
CALLO BLANCO Y ENVERDECIDO DE MAIZ".**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA AGRICOLA
P R E S E N T A :
TERESITA DE J. DEL ROSARIO BUENOSTRO

ASESORA: DRA. ROSARIO A. MUROZ CLARES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

ABRIL / 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
" Caracterización de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de caldo blanco y enverdecido de maíz ".

que presenta la pasante Teresita de Jesús del Rosario Buenrostro con número de cuenta: 7738190-9 para obtener el TÍTULO de: Ingeniera Agrícola .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Febrero de 1995

PRESIDENTE	<u>Dra. Rosario A. Muñoz Clares</u>
VOCAL	<u>Biol. Elba Martínez Holguín</u>
SECRETARIO	<u>Ing. Francisco Cruz Pizarro</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Guillermo Basante Butrón</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Javier Vega Martínez</u>

Rosario A. Muñoz Clares
Elba Martínez Holguín
Francisco Cruz Pizarro
Guillermo Basante Butrón
Javier Vega Martínez

UAE/SEP/VAP/01

FALLA DE ORIGEN

*El presente trabajo se realizó en
el Departamento de Bioquímica,
de la Facultad de Química, U.N.A.M.,
bajo la dirección de la:*

DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES.

...

Y del seno de la tierra silenciosa y adormecida,
surgió un himno, y dijo el himno:

"Siento en mí, que un Dios anida, algo va a brotar
de mí; algo etéreo, extraño al gérmen que
fragaban mis entrañas; algo inmenso, como cimas
de las más altas montañas"

Y sigo diciendo así:

"La preñez de mis botones, augurio de las rosas;
muchos gérmenes aguardan que les digan

"¡ Transformaos !", ...

Anado Neruo

("Canto a Morelos")

FALLA DE ORIGEN

A mis PADRES, porque me han apoyado
incondicionalmente durante toda mi
vida.

A mis HERMANOS, por haber estado
presentes cuando los necesité.

A mis CUÑADOS, porque siempre me
dieron una palabra de aliento.

A DIOS, por haberme dado la
gran oportunidad de vivir.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por la confianza, paciencia y apoyo que me dio durante la dirección y asesoría del presente trabajo.

Al departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, de la UNAM, por todas las facilidades proporcionadas para la parte experimental de esta tesis.

Al Biólogo, Carlos Mújica Jiménez y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su apoyo técnico y moral.

A mis compañeros y amigos, Ana Luz, David y Elisa, y a Martín, Alma y Cristina, por el apoyo que de una u otra forma me dieron

A los miembros del Jurado; Dra. Rosario A. Muñoz Clares,
Bióloga, Elba Martínez Holguín,
Ing. Francisco Cruz Pizarro,
Ing. Guillermo Basante Butrón e
Ing. Javier Vega Martínez,
por el tiempo y la atención que dedicaron en la revisión de este trabajo.

I N D I C E

	Pag.
ABREVIATURAS.	I
JUSTIFICACION.	II
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	5
2.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas.	5
2.1.1 Reacción catalizada por fosfoenolpiruvato carboxilasa.. . . .	5
2.1.2 Localización de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.. . . .	6
2.1.3 Funciones que desempeña fosfoenolpiruvato carboxilasa.. . . .	6
2.1.3.1 Regulación del pH citoplásmico.	6
2.1.3.2 Regulación de la apertura de estomas.. . . .	6
2.1.3.3 Participación conjunta en el mecanismo de acción de auxinas.	6
2.1.3.4 Síntesis de ácidos dicarboxílicos en raíz.	7
2.1.3.5 Función anaplerótica.	7
2.1.3.6 Germinación.	7
2.1.3.7 Refijación del CO ₂ de origen respiratorio en plantas.	7
2.1.3.8 Función fotosintética.	8
2.1.4 Isoenzimas de PEPC.	9
2.1.5 Características moleculares.	10
2.1.6 Características cinéticas.	11

	Pag.
2.1.7 Regulación de la actividad de PEPC.	12
2.1.7.1 Regulación por metabolitos.	12
2.1.7.2 Regulación por luz.	13
2.1.8 Características inmunológicas de fosfoenolpiruvato carboxilasa.	14
2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales.	14
2.2.1 Definición de cultivo de tejidos vegetales.	15
2.2.2 Base teórica de cultivo de tejidos.	15
2.2.3 Antecedentes.	15
2.2.4 Aspectos metabólicos en la formación del callo.	16
2.2.5 Uso de cultivo de tejidos vegetales para la experimentación bioquímica.	17
2.2.6 Estudios realizados en callo.	18
2.2.6.1 Anatomía.	18
2.2.6.2 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa en callo.	19
2.2.6.3 Estudios inmunológicos.	19
2.2.6.4 Estudios cromatográficos y electroforéticos.	20
III. HIPOTESIS.	21
IV. OBJETIVOS.	21
V. MATERIALES.	22
5.1 Material biológico.	22
5.2 Reactivos.	22
5.3 Equipo.	24

	Pag.
VI. METODOS.	26
6.1 Obtención del callo.	26
6.2 Extracción de la enzima.	28
6.3 Determinación de actividad de la enzima <i>PEPC</i>	29
6.4 Determinación de proteínas.	31
6.5 Cuantificación de proteínas de <i>PEPC</i>	32
6.5.1 Electroforesis desnaturalizante.	32
6.5.2 Transferencia de proteínas.	34
6.6 Purificación parcial de la enzima <i>PEPC</i> de callo blanco.	36
6.7 Inmunoprecipitación de <i>PEPC</i> de callo blanco.	38
6.8 Análisis de datos.	40
VII. RESULTADOS.	41
7.1 Estudios con callo blanco.	41
7.1.1 Actividad específica de <i>PEPC</i> durante el crecimiento del callo.	41
7.1.2 Purificación parcial de <i>PEPC</i>	43
7.1.3 Propiedades cinéticas de <i>PEPC</i>	47
7.1.3.1 Cinética de saturación por PEP-Mg.	47
7.1.3.2 Respuesta de la actividad de <i>PEPC</i> a efectores.	47
7.2 Estudios con callo enverdecido.	49
7.2.1 Actividad específica de <i>PEPC</i>	49
7.2.2 Propiedades cinéticas de <i>PEPC</i>	50
7.2.2.1 Cinética de saturación por PEP-Mg.	50
7.2.2.2 Respuesta de la actividad de <i>PEPC</i> a efectores.	52

	Pag.
7.3 Estudios Inmunológicos.	52
7.3.1 Inmunodetección de fosfoenolpiruvato carboxilasa.	52
7.3.2 Inmunoprecipitación de PEPC en extractos crudos.	53
VIII. DISCUSION.	57
8.1 Obtención del callo.	57
8.2 Características de PEPC.	58
8.3 Cuantificación de PEPC.	60
IX. CONCLUSIONES.	64
APENDICE.	65
X. BIBLIOGRAFIA.	68

INDICE DE TABLAS.

	Pag.
Tabla I.- Soluciones Stock del Medio de Cultivo MURASHIGE-SKOOG (M-S).	66
Tabla II.- Preparación de los Medios de Cultivo R2 Y R4.	67
Tabla III.- Purificación parcial de PEPC de callo blanco.	45
Tabla IV.- Actividad específica en extractos crudos de la enzima PEPC de diferentes tejidos de maíz.	50

INDICE DE FIGURAS.

	Pag.
Fig. 1.- Corte transversal de hoja de plantas C3 y C4.	3
Fig. 2.- Semilla de maiz, variedad sintética VS-22.	23
Fig. 3.- Siembra de inducción de callo.	23
Fig. 4.- Inducción de callo blanco, 14 días de cultivo.	23
Fig. 5.- Inducción de callo blanco, 21 días de cultivo.	23
Fig. 6.- Curva patrón de proteínas.	33
Fig. 7.- Crecimiento de callo blanco.	42
Fig. 8.- Actividad específica de PEPC de callo blanco.	44
Fig. 9.- Perfil de elución de PEPC de callo blanco.	46
Fig. 10.- Cinética de saturación de PEPC de callo blanco.	48
Fig. 11.- Cinética de saturación de PEPC de callo enverdecido.	51
Fig. 12.- Detección de PEPC de callo blanco y enverdecido.	54
Fig. 13.- Inmunoprecipitación de PEPC de callo blanco.	56

ABREVIATURAS.

A T P	_____	Adenosin trifosfato.
A M P	_____	Adenosin monofosfato.
Glu-6-P	_____	Glucosa-6-fosfato.
M D H	_____	Enzima málico deshidrogenasa.
M E	_____	Enzima málica.
M E A	_____	Medio de enverdecimiento con almidón.
M E G	_____	Medio de enverdecimiento con glucosa.
M - S	_____	Medio de cultivo de Murashige - Skoog.
NADP	_____	Nicotín adenín dinucleótico fosfato.
NADPH	_____	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.
OAA	_____	Acido oxalacético.
PEP	_____	Fosfoenolpiruvato.
PEPC	_____	Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PPDK	_____	Fosfoenolpiruvato dikinasa.

JUSTIFICACION

El objetivo principal de la investigación agronómica en el país y en el mundo entero es el de mejorar los rendimientos y la calidad de los productos agrícolas, así como aumentar la productividad para poder abastecer a la población que se encuentra en constante crecimiento.

En la llamada "Revolución Verde", los grandes avances que se obtuvieron fueron a base de manipular el medio ambiente de la planta (fertilizando, y controlando los aspectos fitosanitarios todo a base de agroquímicos), posteriormente se incursionó en la fitotécnica, con el manipuleo de genotipos (es decir, se inducía la polinización ya entre familias, ya entre generaciones, ya al azar, haciendo una selección entre los mejores ejemplares obtenidos).

Pero en algunos casos los resultados han sido contraproducentes ya que la calidad del producto se ha visto disminuida o se ha perdido. Tal es el caso de los duraznos grandes, jugosos y chapeados, pero insípidos, o bien algunos trigos, que al obtener características de resistencia a la sequía o a algunas enfermedades, perdieron la maleabilidad necesaria para la producción de pan o harinas.

En la actualidad el país vive problemas muy serios con la producción agrícola, ya que se siguen usando agroquímicos en forma indiscriminada, deteriorando así el agroecosistema, de tal manera que existe la necesidad de dar solución a dicho problema, a corto, mediano y largo plazo.

Una forma de empezar a dar soluciones a mediano y largo plazo es a través de la investigación, tanto en laboratorio como en campo.

El compromiso que todo agrónomo tiene ante la sociedad, es el de dar alternativas de solución, es por esto que se hace necesario incursionar en

el trabajo de investigación como el presente, que tiene como objetivo conocer parte del mecanismo bioquímico de la fotosíntesis (específicamente relacionado con la fijación del CO₂ atmosférico, en plantas C₄, que caracteriza a estas como plantas con mayores rendimientos que las C₃).

La agronomía por ser interdisciplinaria requiere de todo conocimiento que influya en el aumento de la calidad y cantidad de la producción.

Por último, es necesario recordar que todo fenómeno que se observa en la agricultura (específicamente en las plantas), son consecuencias de una cantidad enorme de eventos bioquímicos.

I. INTRODUCCION.

La fotosíntesis es un proceso metabólico fundamental para todos los vegetales. Consiste en la síntesis de carbohidratos a partir del CO₂ atmosférico y agua, mediante la absorción de la energía radiante y su conversión a potencial químico, y es el proceso básico implicado en el crecimiento de las plantas.

Con base en esto, una de las alternativas para hacer frente a la demanda creciente de alimentos a nivel mundial es conseguir un incremento en la eficiencia del proceso fotosintético.

Las plantas han sido convenientemente clasificadas en plantas C₃, C₄ y CAM en base a las diferencias del metabolismo fotosintético de asimilación del CO₂ atmosférico, y según el número de carbonos de que consta la molécula que resulta como primer producto de dicha fijación.

Además de la diferencia de la fijación del CO₂, las plantas C₃ y C₄ se diferencian en su estructura anatómica foliar.

En las plantas C₃ la fijación del CO₂ se lleva a cabo directamente en el ciclo de Calvin, donde la enzima encargada de fijar el CO₂ es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). Esta enzima tiene una doble función; carboxila durante el proceso fotosintético y oxigena en el inicio del proceso de fotorrespiración.

Por tal motivo en las plantas C₃ existe una competencia entre el CO₂ y el O₂ como sustratos de la misma enzima, provocando con esto una baja eficiencia en el proceso fotosintético.

En cambio, las plantas C₄ poseen un mecanismo, el cual a través de concentraciones altas de CO₂ evita que Rubisco use O₂ como sustrato, y, una anatomía especial, llamada anatomía Kranz, la cual consta de una capa de

células especializadas (células de vaina vascular) que rodean a los haces vasculares y, adyacente a esta capa se encuentran las células del mesófilo (Fig.1). Es en las células del mesófilo donde se realiza la primera fijación del CO₂ atmosférico, el cual es transportado a las células de vaina vascular, donde se lleva a cabo el ciclo de Calvin. Esto provoca un aumento de la concentración del CO₂ en estas últimas células, disminuyendo la competencia con el O₂ por la Rubisco, y haciendo así más eficiente el proceso fotosintético en este tipo de plantas.

La enzima responsable de la primera fijación del CO₂ atmosférico es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), la cual fija el CO₂ en una molécula de tres carbonos, fosfoenolpiruvato (PEP), dando como producto una molécula de cuatro carbonos, el oxalacetato y fósforo inorgánico.

Dada la importancia de esta enzima se han realizado diversos estudios sobre sus características catalíticas, de regulación, y moleculares, entre otras.

A la fecha se sabe que la fosfoenolpiruvato carboxilasa está ampliamente distribuida en el reino vegetal, donde desempeña diversas funciones metabólicas (dependiendo del tejido en que se encuentre), además de la función fotosintética antes mencionada (en plantas C₄ y con metabolismo ácido crasuláceo).

El maíz es la planta C₄ en la que más se ha estudiado esta enzima. Se han encontrado dos isoformas, la isoenzima anaplerótica (en tejidos no fotosintéticos) y la isoenzima fotosintética (en hoja verde).

La isoenzima fotosintética es la forma que más se ha estudiado, dada su importancia en el proceso fotosintético, mientras que la forma anaplerótica está escasamente estudiada.

Debido a la importancia de ambos metabolismos, el anaplerótico y el

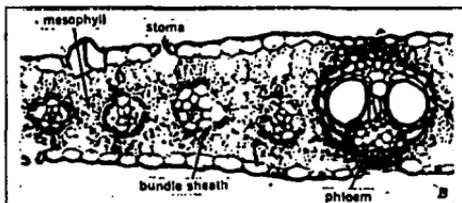
pal, (PARENQUINA EN EMPALIZADA). st, (ESTOMA). e, (EPIDERMIS).



C3 (Tabaco)

spo, (PARENQUINA ESPONJOSO). vb, (HAZ VASCULAR).

mesophyll, (CELULAS DEL MESOFILO). stoma, (ESTOMA).



C4 (Maiz)

bundle sheath, (CELULAS DE VAINA VASCULAR). phloem, (FLOEMA).

FIG. 1 - CORTE TRANSVERSAL DE HOJA DE PLANTA C₃ Y C₄ DONDE SE OBSERVAN LAS DIFERENCIAS MORFOLOGICAS.

FOTOGRAFIAS TOMADAS DE "PLANT ANATOMY" DE KATHERINE ESAU, ED. OMEGA. (1965). (10).

fotosintético, hemos emprendido el estudio y caracterización de la isoenzima anaplerótica en tejido de callo blanco (células desdiferenciadas y sin clorofila) y los cambios que esta enzima sufra como consecuencia del enverdecimiento del callo.

Dichos estudios cobran una relevancia especial, ya que la búsqueda de un incremento de la productividad en plantas C₃, introduciendo características propias de C₄, plantea como problema central conocer el grado de relación entre las isoformas de PEPC, la anaplerótica y la fotosintética, dentro de una misma planta.

Este trabajo pretende además llegar a conocer si el enverdecimiento del callo blanco de maíz induce a la aparición o síntesis de la forma fotosintética de PEPC.

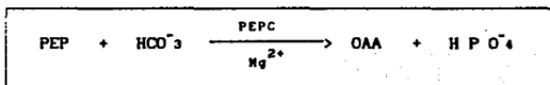
II. ANTECEDENTES.

2.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31.) es una enzima que se encuentra en plantas, algas y bacterias desempeñando diversas funciones (39). A continuación describiremos algunos de los conocimientos que se tienen en la actualidad sobre esta enzima y que son relevantes para el presente trabajo.

2.1.1 Reacción catalizada por fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La enzima PEPC, cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de Mg^{2+} , para dar como producto el ácido oxalacético (OAA) y fósforo inorgánico, como lo indica la siguiente reacción.



Esta reacción tiene un cambio de energía libre alto ($\Delta G =$ de -6 a -8 Kcal/mol) y es prácticamente irreversible.

Estas características fueron primeramente descritas por Bandurski, quien además demostró que para que se lleve a cabo la reacción es necesario la presencia de Mg^{2+} (2).

También se ha demostrado que la enzima usa como sustrato al bicarbonato (HCO_3^-) para carboxilar a PEP, y no CO_2 como ocurre con otras enzimas carboxilantes (26).

Por otra parte, estudios recientes indican que el sustrato preferencial de la enzima es el complejo PEP-Mg (64,48) y no PEP libre como se había creído (38).

2.1.2 Localización de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Esta enzima se encuentra en todos los tejidos vegetales de plantas C₃, C₄ y CAM realizando diversas funciones, y se ha reportado que se localiza en el citoplasma (6,41).

2.1.3 Funciones que desempeña fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La función metabólica de la fijación del CO₂ y la síntesis de ácidos dicarboxílicos depende del tipo y fisiología del tejido donde se encuentre. A continuación se describen algunas de las funciones que se le han adscrito:

2.1.3.1 Regulación del pH citoplásmico: El citoplasma requiere mantenerse entre límites de pH estrechos, lo cual puede lograrse mediante un balance entre carboxilación y descarboxilación. Davis (60) propuso un mecanismo regulador del pH citoplásmico que implicaría, por un lado, la actividad de PEPC mediante la fijación del CO₂, carboxilación que acoplada con la enzima málica deshidrogenasa (MDH) dependiente de NADPH, generaría ácidos orgánicos, disminuyendo así el pH, y por otro lado, el aumento del pH puede ser provocado por la descarboxilación del malato mediante la enzima málica (ME), dependiente de NADP.

2.1.3.2 Regulación de la apertura de estomas: En las células guarda de la epidermis, donde PEPC es bastante activa, se ha reportado un incremento en la concentración de malato durante la apertura de los estomas (65). Este malato parece originarse a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) por la acción conjunta de las enzimas PEPC y MDH.

2.1.3.3 Participación en el mecanismo de acción de auxinas: La adición de auxinas a muchos tejidos vegetales se traduce en una salida de H⁺ a la pared celular (51) incrementando su extensibilidad. Esto puede ser

provocado por la activación de enzimas o por rupturas de enlace "ácido-lábiles". Al mismo tiempo se registra una acumulación de K^+ y malato, y un incremento en la velocidad de fijación del CO_2 en la obscuridad, lo que implica a *PEPC* en el mecanismo de acción de estos fitorreguladores.

2.1.3.4 Síntesis de ácidos dicarboxílicos en raíz; En tejidos meristemáticos de raíz existen evidencias que indican que el CO_2 se fija via *PEPC* para formar oxalacetato (OAA), el que a su vez es reducido a malato por MDH (17,18). La señal que dispara la síntesis de los ácidos puede ser un aumento del pH citoplásmico, como consecuencia de la actividad de toma de iones de la raíz.

2.1.3.5 Función anaplerótica; En la biosíntesis de aminoácidos, la enzima *PEPC* desempeña un papel importante, ya que su funcionamiento alimenta la poza de intermediarios del ciclo de Krebs (8), que de otra manera serían agotados por su uso como esqueletos carbonados para la síntesis de ciertos aminoácidos.

2.1.3.6 Germinación; En las etapas tempranas de la germinación, el incremento de esta actividad enzimática sugiere que *PEPC* junto con MDH, constituyen el sistema proveedor de malato en los estadios tempranos de desarrollo de la plántula. Esto se ha reportado en estudios realizados con algodón y sorgo (40).

2.1.3.7 Refijación del CO_2 de origen respiratorio en plantas; En trabajos realizados con *Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L. se ha reportado que en vaina se presentan dos tipos de fijación de CO_2 , una externa, que se lleva a cabo en la epidermis de la vaina y que contiene todas las características morfológicas y enzimáticas (presencia de la enzima Rubisco) para la fotosíntesis tipo C_3 , y una fijación de CO_2 interna que se lleva a cabo en el tejido interior de la vaina y que fija el CO_2 de

origen respiratorio que se acumula en la cavidad de la vaina. *PEPC* es la enzima que fija este CO_2 de origen respiratorio, ya que se ha encontrado una alta actividad específica de esta enzima en dicho tejido (1,43).

2.1.3.8 Función fotosintética; *PEPC* realiza una función fotosintética clara en las hojas verdes de las especies con metabolismo C_4 y ácido crasuláceo (CAM).

En 1966 (12) se propuso por primera vez que en cierto tipo de plantas se llevaba a cabo una ruta cíclica basada en la reacción de la β -carboxilación del PEP catalizada por la enzima *PEPC*. Estas plantas se denominaron plantas con metabolismo fotosintético C_4 .

Las especies C_4 han desarrollado una compleja compartimentalización de enzimas y un igualmente complejo transporte de compuestos entre dos tipos celulares: las células de vaina vascular, localizadas alrededor del xilema y el floema, y adyacentes a éstas, las células del mesófilo.

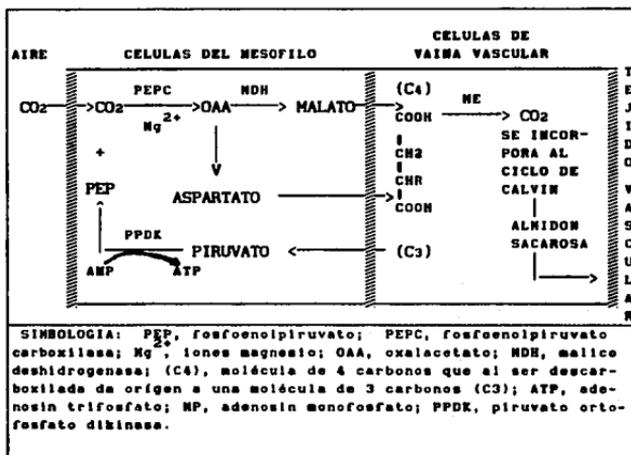
El CO_2 atmosférico, que penetra a través de los estomas, es fijado primeramente en el citoplasma de células del mesófilo en la molécula de tres carbonos, PEP, mediante la reacción de carboxilación catalizada por la enzima *PEPC*, obteniendo como producto la molécula de cuatro carbonos, el ácido oxalacético (OAA).

El OAA, por ser bastante inestable es rápidamente convertido a malato, por la enzima MDH, dependiente de NADPH, o, a aspartato por una transaminasa. El malato o aspartato formados son transportados a las células de vaina vascular, donde malato se descarboxila por la enzima málico (ME) dependiente de NADP, liberando así CO_2 y un ácido de tres carbonos (piruvato en el caso de malato, o alanina en el caso de aspartato).

El CO_2 liberado es recapturado por la enzima Rubisco para alimentar

el ciclo de Calvin; el piruvato es transportado nuevamente a las células del mesófilo, donde es utilizado para la síntesis de PEP, mediante la reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dikinasa (PPDK), con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP sintetizado va a servir nuevamente como sustrato de PEPC, cerrando así el ciclo de intermediarios de la ruta C₄.

El siguiente esquema trata de describir en forma simplificada el proceso fotosintético de asimilación del CO₂ atmosférico de las plantas C₄:



2.1.4 Isoenzimas de fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Se han descrito diferentes formas moleculares (isoenzimas) con actividad de PEPC, asociadas a diferentes funciones fisiológicas.

La enzima de hoja de plantas C₃, C₄ y CAM son diferentes en sus propiedades físicas, cinéticas y moleculares (29,62,67).

Sin embargo, también dentro de las planta C₃ se han descrito diferentes formas moleculares de esta enzima, atribuyéndoseles diferentes funciones metabólicas (57,62).

Por otra parte, se ha demostrado que las formas enzimáticas presentes en hoja verde, difieren de las formas encontradas en hoja etiolada, tanto de plantas C₃ como de las plantas C₄ (11).

Se ha sugerido que las isoformas de *PEPC* pueden clasificarse en tres grupos (57), en base a la actividad específica de los extractos crudos y según su *K_m* para PEP:

- 1) enzimas de plantas C₃ e isoformas anapleróticas; con una baja *K_m* (PEP) y una baja actividad específica.
- 2) enzimas CAM; con una baja *K_m* (PEP) y una alta actividad específica.
- 3) enzimas de plantas C₄; con una elevada *K_m* (PEP) y una alta actividad específica.

2.1.5 Características moleculares.

La enzima *PEPC* en su forma nativa es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas, con una masa molecular de aproximadamente 400,000 daltones (39,59,25), aunque algunos otros reportes muestran que puede existir en diferentes formas oligoméricas, dímeros o monómeros inactivos o con muy baja actividad (63,54,67).

Se ha deducido la secuencia de aminoácidos de *PEPC* a partir de cDNA de hoja de maíz. La enzima está compuesta por 970 restos de aminoácidos, con una masa molecular de 109,408 daltons (69).

También se han identificado varios aminoácidos esenciales para la actividad de *PEPC*, entre los que están; cisteínas, histidinas, argininas y lisinas.

Cisteínas: En análisis de aminoácidos de *PEPC*, se reveló un contenido de al menos ocho cisteínas por subunidad, de las cuales cuatro se hallan formando puentes disulfuro en la enzima activa y las cuatro restantes se hallan como grupos sulfhidrilos libres (53,15).

La modificación química de estos grupos parece llevar aparejada la disociación de la molécula tetramérica en dímeros y monómeros (61).

Histidinas: Se ha identificado a una histidina que participa en la unión de Mg^{2+} y PEP, pero no en la catálisis (38,39,67).

Argininas y lisinas: Estudios realizados con enzima de hoja de maíz, usando modificadores químicos, muestran que dos argininas y cuatro lisinas por tetrámero son esenciales para la actividad de *PEPC*, y que estos grupos son protegidos por PEP frente a la modificación química (14,28,66).

2.1.6 Características cinéticas.

Ting y Osmond (57) realizaron un estudio sobre las características cinéticas de la enzima *PEPC* en hojas de plantas C3, C4, y CAM. En diferentes especies de plantas C4 encontraron que la velocidad máxima, (V_{max}), oscilaba entre los valores de 9 a 53.5 moles/min/gr de peso fresco, siendo en promedio 22.5 moles/min/gr de peso fresco (valores con un rango muy amplio).

En plantas C3 encontraron valores de V_{max} entre 0.18 a 2.52 moles/min/gr de peso fresco, siendo el valor promedio de 15 a 20 veces menor que el valor promedio de plantas C4. En plantas CAM encontraron un valor promedio cercano al valor promedio de plantas C4.

Sin embargo, los datos en la literatura sobre la actividad específica de la enzima purificada muestran que ésta oscila entre 20 y 30 μ mol/min/mg de proteína para las preparaciones más puras, tanto en el caso

de las isoenzimas fotosintéticas de hoja de plantas C₄ y CAM, como de las isoformas anapleróticas presentes en tejidos no fotosintéticos y en hojas de plantas C₃ (20,16,31). Esto indica que la cantidad de PEPC en hojas de plantas C₄ y CAM es mucho mayor que en hojas de plantas C₃.

La enzima PEPC de tejidos no fotosintéticos o de tejidos de plantas C₃ presenta una K_m (PEP) considerablemente más baja que en el caso de tejidos fotosintéticos de plantas C₄, con valores de aproximadamente 0.1 mM para C₃ y de 1 a 3 mM para C₄ (47).

2.1.7 Regulación de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa

2.1.7.1 Regulación por metabolitos.

PEPC es una enzima alostérica, es decir presenta además del sitio catalítico o sitio activo, sitio(s) de regulación.

Se han reportado diversos efectores que regulan la actividad de la enzima, pero los más estudiados son: malato, que actúa como inhibidor, y glucosa-6-fosfato (Glu-6-P), que actúa como activador.

Malato es un inhibidor mucho más potente de la enzima extraída de hoja de C₄ y CAM, es decir de la enzima fotosintética, que de la enzima de plantas C₃ o de tejidos no fotosintéticos. El efecto inhibidor de malato es en todos los casos dependiente del pH (50).

La inhibición de la enzima PEPC por malato constituye una forma clara de regular la producción de este compuesto. Cuando hay una acumulación de malato, éste se une al sitio alostérico de la enzima indicando que hay una sobreproducción de malato, el cual no está siendo consumido, y de esta forma inhibe la actividad de la enzima PEPC y su propia producción (68).

Glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) se ha descrito como activador de la

enzima de hoja de plantas C₄ y CAM (32,56). Se ha reportado que en la enzima extraída de hoja de maíz, Glu-6-P cambia la cinética de saturación por el sustrato PEP, de sigmoïdal a cinética michaeliana (59).

El efecto de Glu-6-P en la actividad de la enzima de PEPC de hoja verde de maíz ha llegado a ser hasta del 300 % a pH 7, PEP 1 mM y a una concentración de Glu-6-P 10mM, en enzima extraída de plántulas de maíz de 7 a 9 días de edad (7). En cambio, la enzima de hoja etiolada de caña de azúcar, es insensible a este efector (11). Por tanto, Glu-6-P parece ser sólo un importante regulador de la isoenzima fotosintética de PEPC.

Por otro lado se sabe que existe un sitio alostérico específico (en la enzima) al cuál se une Glu-6-P, esta unión provoca una modificación conformacional que conlleva un aumento de la afinidad por su sustrato (9,32).

El mecanismo fisiológico de la activación de PEPC por Glu-6-P aún no se conoce con certeza, pero hay evidencias de que existe una interrelación entre las células del mesófilo y las células de vaina vascular (8).

2.1.7.2 Regulación por luz.

Estudios realizados con hojas verdes de plantas C₄ y CAM tratadas con periodos cortos de iluminación y oscuridad, indican que la luz está involucrada con la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima (21). Esta regulación se lleva a cabo por fosforilación y desfosforilación del grupo hidroxilo de la serina, Ser-15 en el caso de PEPC de maíz (19).

Estas dos formas de PEPC interconvertibles por modificación covalente postraduccional, la forma de luz (fosforilada) y la forma de oscuridad (desfosforilada) difieren en que la forma de luz presenta una

mayor afinidad por su sustrato y una menor sensibilidad a malato que la forma de obscuridad (45,46,13), lo que hace que sea más activa durante el día a pesar de que la concentración de malato intracelular es más elevada que durante la noche (46).

2.1.8 Características inmunológicas de fosfoenolpiruvato carboxilasa

Las técnicas inmunológicas se han empleado frecuentemente para conocer la similitud conformacional y/o identidad estructural de las moléculas enzimáticas.

En el caso de las isoenzimas de PEPC, se ha reportado que anticuerpos obtenidos frente a la enzima purificada de hoja verde de plantas C₄ cruzan con las formas de PEPC de hoja verde, de hoja etiolada y de raíz de plantas C₃, C₄ y CAM (41,42).

En otros estudios, realizados con maíz (36,24), se obtuvieron anticuerpos anti-PEPC de hoja verde, y al adicionarlos a preparaciones enzimáticas de las formas aisladas de hoja verde y hoja etiolada, en una inunoprecipitación, encontraron que en hoja verde el reconocimiento del anticuerpo fue completo ya que inhibió o precipitó a el 100% de actividad la enzima, mientras que en hoja etiolada la precipitación o inhibición de la actividad fue sólo del 45%. Esto demuestra que existe un cierto grado de homología entre las dos isoenzimas (la obtenida de hoja verde y la de hoja etiolada).

2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales.

La base de la metodología de la investigación es el aislamiento de un fenómeno para su estudio y/o reproducción, por lo cual las técnicas de cultivo de tejidos vegetales constituyen una excelente herramienta para el estudio fisiológico y fisicoquímico del metabolismo de los vegetales,

principalmente a nivel bioquímico.

2.2.1 Definición de cultivo de tejidos.

El término de cultivo de tejidos vegetales es comúnmente usado para definir cualquier tipo de cultivo vegetal "in vitro" bajo condiciones asépticas, tales como: cultivo de plantas (plántulas y plantas); cultivo de embriones (aislamiento de embriones maduros e inmaduros); cultivo de órganos (aislamiento de órganos vegetales como raíz, tallo, ápices, primordios foliares y primordios o partes de flores inmaduras); cultivo de tejidos desdiferenciados o callo (proliferación de tejidos o células desdiferenciados obtenidos de segmentos u órganos vegetales); y cultivos en suspensión (aislamiento de células o agregados muy pequeños de células dispersas y creciendo en un medio líquido) (55).

2.2.2 Base teórica del cultivo de tejidos.

El principio en el que se basan las técnicas de cultivo de tejidos vegetales es la teoría celular, la cual dice que toda célula vegetal, cualquiera que sea su especialización, posee toda la información genética para reproducir una planta con todas las características de la planta de la cual proviene. Esta teoría de la totipotencialidad de la célula fue postulada en 1838-1839 por Schleiden y Schwann (44).

2.2.3 Antecedentes

Fue en 1888 cuando Haberlandt realizó algunos experimentos, con el fin de comprobar la teoría celular, empleando un medio de cultivo compuesto por sacarosa, asparagina y peptonas como reserva de nutrientes. Sus resultados no fueron publicados hasta 1902. Las células lograron mantenerse vivas durante 20 a 27 días, presentando solo un hinchamiento (hidratación)

del tejido. Posteriormente y debido a que existían diferencias en la respuesta bajo condiciones "in vitro" en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (teniendo una mejor respuesta estas últimas), en 1940 Blakeslee propuso hacer uso de la leche de coco en el medio de cultivo, por ser un líquido del endospermo del embrión.

Pero no fue sino hasta 1948 que Caplin y Steward y un poco más tarde Morel usaron leche de coco en el medio de cultivo, obteniendo una mayor proliferación de embriones en plantas monocotiledóneas, contribuyendo así a mejorar el medio de cultivo para éstas (44).

En 1962 Murashige y Skoog (33) proponen un medio de cultivo en donde asocian fitoreguladores (auxinas, citoquininas, giberelinas, entre otras) y soluciones de minerales, obteniendo el crecimiento de nuevos tejidos. Este medio de cultivo aún es usado en la actualidad (22,49,52,24)

En cultivo de tejidos vegetales, la base de un medio de cultivo es una mezcla de sales minerales, combinada con macro y microelementos esenciales, además sacarosa como fuente de carbono. Los suplementos usuales son: vitaminas, aminoácidos, fitoreguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), algún quelante como EDTA y en ocasiones un extracto natural como leche de coco (Tabla I y II, Apéndice).

En la bibliografía se ha reportado a las plantas dicotiledóneas como un adecuado material para establecer un cultivo bajo condiciones "in vitro" (55), caso que no ocurre con las plantas monocotiledóneas, ya que éstas son muy difíciles de establecer bajo estas condiciones. Esto probablemente se debe al alto grado de diferenciación celular que presentan estas últimas plantas.

2.2.4 Aspectos metabólicos en la formación del callo.

La inducción del callo a partir de un explante ocurre cuando éste

entra en contacto con el medio de cultivo (conocido para la inducción) y bajo condiciones controladas. En ocasiones, el explante puede ser tejido uniforme compuesto de un solo tipo celular, sin embargo, estas células que aparentemente son uniformes pueden llegar a tener marcadas diferencias en el contenido de DNA en su núcleo.

El proceso de la formación del callo puede ser dividido en tres fases principales:

1) Fase de inducción; Durante esta fase las células inician su división, y su metabolismo y su tamaño se incrementa y la duración de esta fase varía con el estado fisiológico del explante inicial y de las condiciones del cultivo.

2) Fase de dediferenciación celular; Se inicia en la periferia del explante presentando una regresión que involucra un retorno progresivo a un estado meristemático (dediferenciación celular).

3) Fase de diferenciación celular; La formación de estructuras es producto de la diferenciación celular, este evento está regido por una división celular continua, con un tamaño celular más o menos constante (55).

Cada uno de los estados está denominado por su función predominante, no siendo términos exclusivos, (ambas, división y diferenciación se llevan a cabo en la segunda y tercera fase).

En general el crecimiento del tejido de callo se debe a la continua división celular (55).

2.2.5 Uso del cultivos de tejidos para la experimentación bioquímica.

El empleo de las técnicas de cultivo de tejidos para la obtención del material biológico en la investigación de biosíntesis y estudios fisiológicos ha servido para extrapolar sus resultados a las plantas

completas. Recientemente se ha usado para seguir el desarrollo de cloroplastos y su capacidad fotosintética bajo la influencia de la luz (55).

2.2.6 Fosfoenolpiruvato carboxilasa presente en callo.

Desde ya hace varios años se ha hecho uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en algunas investigaciones realizadas sobre la fotosíntesis, tanto de plantas C₃, C₄ y CAM (37).

La limitada información que se tiene sobre el desarrollo de la maquinaria ha motivado a los investigadores a hacer uso de cultivo de tejidos vegetales en los estados iniciales de desarrollo del cultivo, es decir, en los estados de dediferenciación celular (tejido caloso).

El uso de estas técnicas (dediferenciación y rediferenciación celular) hace posible separar la anatomía de la hoja, de su función, bajo condiciones controladas, lo cual permite el estudio de los procesos fisiológicos en forma aislada.

A continuación se hace una breve descripción de los aspectos relevantes de las investigaciones realizadas en callo.

2.2.6.1 Morfología del tejido del callo.

Se ha reportado que la morfología del tejido de callo blanco de maíz (planta C₄) se compone de células pequeñas, isodiamétricas, conteniendo pequeñas vacuolas (callo de 7 meses de cultivo) (49). En cuanto a la morfología del callo enverdecido de planta C₄ (*Portulaca oleracea*, L.) se ha observado que presentan células parenquimatosas, grandes, vacuoladas y con cloroplastos. Dentro del tejido están presentes células lignificadas ubicadas al azar por todo el tejido (22), lo mismo ocurre en callo de maíz.

2.2.6.2 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa en callo.

La actividad de *PEPC* de callo verde de tabaco (C3) aumenta hasta un 300% en los primeros 5 días de exposición a la luz, disminuyendo posteriormente a los valores iniciales a los 16 a 20 días, y Rubisco aumenta su actividad 10 veces a los 8 días, manteniéndose constante (35, 36).

La actividad de *PEPC* de callo enverdecido es 3 veces superior a la actividad de *PEPC* de callo blanco (50).

Con respecto a las características cinéticas de *PEPC* se ha reportado que en callo enverdecido de plantas C3 la $K_m(\text{PEP})$ es de $60 \mu\text{M}$ y $K_m(\text{Mg})$ es $80 \mu\text{M}$, y que el pH no tiene efecto sobre ésta (50). Y en maíz se ha reportado una $K_m(\text{PEP})$ de callo enverdecido similar a la de hoja etiolada (90 y $80 \mu\text{M}$ respectivamente) y 5 veces menor que los valores reportados para hoja verde ($500 \mu\text{M}$) (24).

En estudios sobre los efectos que tienen malato (inhibidor) y Glu-6-P (activador) sobre la enzima *PEPC* de callo verde de plantas C3 (tabaco), se ha observado que malato [10 mM] a pH 7.5 inhibe sólo el 22 % de la actividad, mientras que Glu-6-P [5 mM] solo activó un 38 % en este caso a pH 7.5 (50).

2.2.6.3 Estudios Inmunológicos.

El antisuero obtenido frente a hoja verde de *Sorghum vulgare*, reconoció parcialmente a *PEPC* extraída de callo de tabaco precipitando el 92 % de la actividad con $20 \mu\text{l}$ de antisuero, tanto del tejido obtenido de la fase exponencial como de la fase estacionaria (36). Y anti-*PEPC* obtenida frente a hoja verde de maíz reconoce totalmente a *PEPC* de hoja de maíz ($60 \mu\text{l}$ de antisuero precipitan cerca del 100 % de la actividad), siendo el reconocimiento para *PEPC* de callo verde y de hoja etiolada, parcial, ya que

sólo precipitó el 75 % de la actividad, la primera a los 50 μ l de antisuero y la segunda a los 20 μ l , y al aumentar los volúmenes de antisuero a 80 μ l de antisuero la actividad se mantuvo en el 75 % de inhibición (24).

2.2.6.4 Estudios Cromatográficos y Electroforéticos.

En callo verde de tabaco (C₃) se han detectado dos isoformas de PEPC (I y II) con una movilidad relativa (R_m) electroforética de 0.23 y 0.38 respectivamente (34,36). En ambos estudios PEPC II es el pico mayoritario, la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, en las cromatografías realizadas (en DEAE-Celulosa) apareció sólo una isoforma de PEPC con un peso molecular de 81 kD por subunidad, encontrándose en la fase de crecimiento exponencial un mayor pico en comparación con la fase estacionaria (34,36).

Todas las características que anteriormente se mencionan sobre la isoforma de PEPC en callo tanto para plantas C₃ como C₄ nos dan una idea sobre la mayor similitud con la isoforma de tipo C₃ o la anaplerótica que con la isoforma fotosintética.

III. HIPOTESIS.

La actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de callo blanco de maíz cambia cualitativa y cuantitativamente durante el enverdecimiento del mismo.

En base a los antecedentes bibliográficos antes descritos, nos propusimos los siguientes objetivos.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Estudiar los cambios cualitativos y cuantitativos en la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) que acompañen al enverdecimiento del callo blanco de maíz.

4.2 objetivos particulares.

1. Determinar la actividad específica de la enzima PEPC de callo blanco, durante su crecimiento.
2. Caracterizar esta enzima presente en callo blanco mediante estudios cinéticos.
3. Determinar la actividad específica de la enzima PEPC de callo enverdecido.
4. Cuantificar las proteínas con actividad de la enzima PEPC de callo blanco y enverdecido.
5. Investigar la posible aparición de la isoenzima fotosintética en callo enverdecido.

V. MATERIALES.

5.1 Material biológico.

El material biológico utilizado en este estudio fue semilla de maíz *Zea mays* L., variedad VS-22, certificada (tratada con fungicida), obtenida de Productora Nacional de Semillas (PRONASE). La semilla fue almacenada en bolsas de manta con CaCl_2 como deshidratante, en obscuridad a 15°C .

Del total de la semilla sólo se empleó el embrión (eje embrionario con parte del escutelo), que sirvió como explante para la obtención del tejido de células desdiferenciadas (callo) (Fig. 2).

5.2 Reactivos.

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico, y obtenidos de las siguientes casas comerciales;

De Merck: ácido etilendinitrotetraacético sódico (NaEDTA), cloruro de magnesio (MgCl_2), peroxodisulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), glicerol ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de sodio (NaCl); cloruro de magnesio (MgCl), arena de mar purificada con ácido y calcinada, Tris (hidroximetilaminometano).

De Sigma Chemical Co.: acrilamida, β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sodio (SDS); albúmina sérica bovina, Tween 20, Rojo de Ponceau, N'N'-metilen-bis-acrilamida, β -nicotinamida adenin dinucleótido (NADH), polivinilpirrolidona (PVPP), fosfoenolpiruvato (PEP), malico deshidrogenasa (MDH), ditionitrosol (DTT).

De Pharmacia Fine Chemical: azul dextran, y las resinas Sephadex G-25, DEAE-Sephacel, y Q-Sepharose.

De Aldrich Chemical Company, Inc.: trietanolasina (TEA)

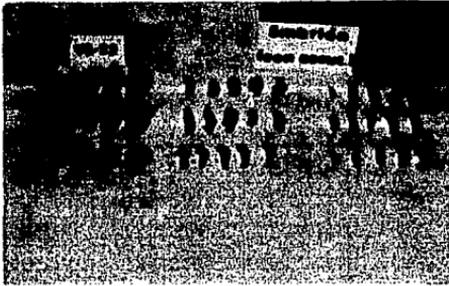


FIG. 2 - Semilla de maíz, variedad sintética (VS-22) y ejes embrionarios con parte del escutelo, para la inducción del callo.

FIG. 3 - Siembra de inducción del callo blanco, mostrando la colocación equidistante de los embriones.

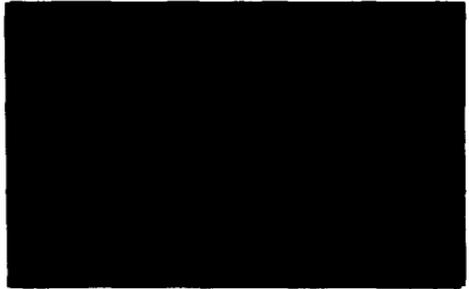


FIG. 4 - Callo blanco, a los 14 días de inducción del cultivo.

FIG. 5 - Callo blanco, a los 21 días de inducción del cultivo.



De Bio-rad: N,N,N,N-tetrametiletilendiamina (TEMED)
De Técnica Química, S.A.: sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
De J. T. Baker: fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) , fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) .
De Bethesda Research Laboratories: membrana de nitrocelulosa Inauno Select, de $0.45 \mu\text{m}$.
Química J V C: fosfato de sodio monobásico y dibásico.

5.3 Equipo.

Para las siembras y resiembras del material biológico se hizo uso de una campana de flujo laminar, y para la esterilización se utilizó una autoclave. El material se incubó en un cuarto oscuro (para callo blanco), y de fotoperiodo (para callo verde), a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

La actividad enzimática se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-65, de doble haz, con control de temperatura integrado, programable y con graficador integrado, con éste mismo espectrofotómetro se determinó la concentración de proteínas.

Los reactivos se pesaron en las balanzas analíticas Sartorius, modelo H-51 con capacidad de $100 \pm 0.0001 \text{ g}$ y Mettler, H-6 con capacidad de $160 \pm 0.0001 \text{ g}$.

Para ajustar el pH, se utilizó un potenciómetro Beckman, con una precisión de ± 0.01 .

En la medición de los volúmenes pequeños, se usaron microjeringas Hamilton, con capacidad de 0.005 a 0.100 ml, y micropipetas automáticas Rainin, con capacidad de 0.025 a 2.5 ml.

En la obtención de la muestra enzimática se usaron las centrifugas Sorvall modelo RC-5B de DuPont Instruments, Beckman modelo JZ-21, y la

ultracentrífuga Beckman modelo L7-65.

Para la conservación de soluciones y reactivos se empleó un refrigerador marca Bendix, con temperatura de 4°C y compartimento de 0°C . Para conservar la actividad enzimática y disminuir al máximo los procesos metabólicos del tejido, se empleó un ultracongelador marca Form Scientific con una temperatura de -70°C .

Para la realización de la electroforesis se usó una cámara para electroforesis marca Hoefer, modelo # SE 2195M y una cámara para electrotransferencia marca LKB, modelo Novablot, 2117-250.

También se usaron platos agitadores con regulación de temperatura, estufa con vacío, colector de fracciones, computadora con impresora, entre otros.

VI. METODOS.

6.1 Obtención del callo.

Para la inducción del callo, se empleó el medio de cultivo de Murashige-Skoog (33), modificado (49,52) Tabla I (apéndice).

Se utilizaron soluciones stock (madre), (Tabla I) y a partir de éstas, se preparó el medio de cultivo (Tabla II,apéndice) tanto para la inducción como para las reselebras del callo.

El pH de ambos medios de cultivo, se ajustó a 5.8 con KOH 0.5 N.

Después de que se aforó al volumen deseado, se agregó el agar a una concentración de 2.5 g/lit y se calentó para disolverlo completamente. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 20 ml. en frascos de cultivo donde se llevó a cabo la siembra y reselebra, según fuera el caso. Finalmente se esterilizaron en la autoclave a 1.6 Lb/cm², durante 15 min.

Los embriones previamente disectados (Fig. 2), se esterilizaron en matraces Erlen-Meyer estériles, de 250 ml de capacidad (100 embriones por matraz), durante 12 min. con una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial Cloralex) a una concentración de 11% , conteniendo además dos gotas de Tween 20 (detergente) y nueve gotas de Microdyn (bactericida).

Al final del tiempo señalado, los embriones se enjuagaron tres veces con agua desionizada y estéril. Ya desinfectado el material biológico se sembró en medio de inducción (R₄) (ver apéndice, tabla II), a razón de 4 embriones por frasco, cuidando que el eje embrionario quedara en contacto con el medio de cultivo (Fig. 3).

Una vez sembrados los embriones, se incubaron durante tres semanas en obscuridad a 25 ± 2°C.

A las tres semanas se procedió a resebrar el callo obtenido en un

medio de cultivo de resiembra (R2) (Fig. 4) (49). La composición de este medio es similar al de inducción, sólo varió la concentración de hormonas (Tabla II). Se realizaron dos resiembras con el fin de eliminar todas las estructuras diferenciadas (plántula, radícula y estructuras filamentosas) y de obtener una mayor cantidad del tejido de callo limpio (Fig. 5).

La incubación de cada resiembra fue de dos semanas y se realizó en las mismas condiciones que en la inducción.

La determinación de la curva de crecimiento del callo se realizó durante la segunda resiembra, de la siguiente forma: Se resembraron cantidades iguales en cada frasco, con el fin de partir de una cantidad conocida de material y desde el primer día se registraron los datos de peso (fresco y seco) y actividad específica (incluyendo el contenido total de proteína soluble).

En cuanto al enverdecimiento del callo, los tratamientos aplicados para la inducción de enverdecimiento del tejido de callo blanco se basaron en variar la fuente de carbono en presencia de luz.

El medio de cultivo para la inducción del callo contiene como fuente de carbono sacarosa. En el caso del medio de cultivo para el enverdecimiento del callo se usó almidón en un lote y glucosa en el otro. Además, a la mitad de cada lote se le aplicó CO₂ atmosférico por periodos de 6 hr continuas diariamente, en una cámara hermética, conectada a un tanque de bioxido de carbono.

Estos callos fueron expuestos a un fotoperiodo de 18 hr luz y 6 hr de obscuridad, a 25°C, durante dos semanas.

La siguiente tabla esquematiza los tratamientos

TRATAMIENTO	CONDICION	FUENTE DE C	CO ₂ Atmosferico	
			CON	SIN
Callo blanco	OBSCURIDAD	SACAROSA	.-.	.-.
Callo verde	LUZ	ALMIDON	MEA	MEA
Callo verde	LUZ	GLUCOSA	MEG	MEG
TOTAL				

MEA: Medio de enverdecimiento con almidón.

MEG: Medio de enverdecimiento.

6.2 Extracción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Se pesó el tejido de callo y se homogeneizó en un mortero que contenía arena de mar y un volumen de solución amortiguadora (relación 1:1 peso/volumen). El homogeneizado se filtró en una capa de nylon y el líquido filtrado se centrifugó a 18,000 rpm, durante 20' a 4°C.

El sobrenadante obtenido se usó como muestra enzimática para la determinación de la actividad de la enzima y la concentración de proteínas.

La solución amortiguadora para la extracción de la enzima contenía:

CONTENIDO	CONCENTRACION
Amortiguador de fosfatos	
de potasio (pH 7.8)	100 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	20 % (v:v)
• PVPP	2 % (p:v)
• β-mercaptoetanol	10 mM

• - Adicionados en el momento de la extracción.

$$A = \frac{\Delta \text{ Abs}}{T} \times \frac{1}{c} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{v}$$

A - Actividad en unidades/ml/min.

Δ Abs - Cambios de absorbancia durante el tiempo considerado de reacción.

T - Tiempo en minutos de la reacción.

c - Coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm ($6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$).

V - Volumen de muestra enzimática usado en el ensayo.

v - volumen total del medio de ensayo en ml.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que carboxila un μmol de PEP por minuto en nuestras condiciones de ensayo.

La actividad específica se determinó dividiendo el valor de u/ml entre los miligramos de proteína que contenía un ml de la preparación enzimática.

EL medio de ensayo estándar fue el siguiente:

Reactivos (solución de almacenamiento)	Concentración	Volumen adicionado (μl)	Concentración final en el medio
TEA-HCL	200 mM	200	100 mM
EDTA	2 mM		
MDH	200 u/ml	10	5 u/ml
NADH	20 mM	4	0.2 mM
NaHCO ₃	1000 mM	4	10 mM
PEP	200 mM	4	2 mM
MgCl ₂	1000 mM	4	10 mM
H ₂ O		variable	
Muestra enzimática		variable	
Volumen total		400	

El pH de la solución amortiguadora de TEA-HCL fue de 7.0, 7.3 y 8. Cuando se midió la sensibilidad a malato, o a Glu-6-P se adicionaron al medio de ensayo 4 µl de una solución de almacenamiento 500 mM de malato o Glu-6-P, quedando una concentración final de estos compuestos en el medio de ensayo de 5 mM.

En ausencia de PEP, o en ausencia de la preparación de PEPC, no hubo actividad, es decir, no hubo cambios de absorbancia.

6.4 Determinación de proteínas.

La concentración total de proteínas solubles se determinó empleando una modificación del método de Bradford (4). Este método se basa en la formación de un complejo entre el reactivo azul de Coomassie (azul brillante G) y los residuos de arginina.

El reactivo azul de Coomassie contiene 0.05 % (p/v) de azul brillante G, en una solución de ácido perclórico al 0.6% (p/v).

Para la elaboración de la curva estándar o curva patrón, se empleó albúmina de suero bovino (BSA) tipo I (libre de ácidos grasos), disuelta en agua a una concentración de 2.5 mg/ml (61).

De esta solución de almacenamiento se tomaron volúmenes equivalentes a 10, 20, 30, 40, 60 y 80 µg de proteína y se colocaron en tubos eppendorf, completándose a 100 µl con agua destilada, se adicionó además 100 µl de la misma solución amortiguadora usada en la activación de la enzima pero sin PVPP.

Las muestras enzimáticas se prepararon de igual manera: se adicionó al volumen de muestra (de 20 a 50 µl) el volumen de la solución amortiguadora para completar a 100 µl, y se adicionó 100 µl de agua destilada por cada tubo problema.

A todos los tubos, tanto de la curva patrón como a los tubos problema se les agregó 1 ml del reactivo azul de Comassie, se agitaron vigorosamente los tubos e inmediatamente después se midió su absorbancia.

Las lecturas de absorbancia fueron tomadas a 595 nm, calibrando con un blanco que contenía 100 µl de agua destilada, 100 µl de solución amortiguadora y 1 ml del reactivo.

La determinación de la concentración de proteínas se hizo interpolando la absorbancia de los tubos problema en la curva patrón de BSA (Fig. 6). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

6.5 Cuantificación de la proteína PEPC.

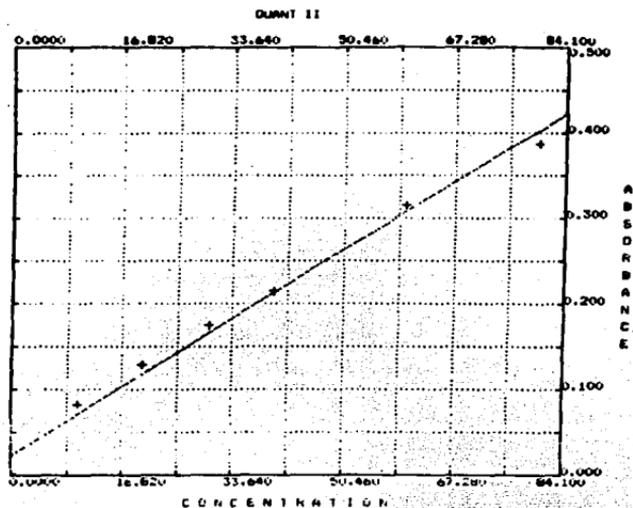
La cuantificación de la proteína de PEPC se hizo mediante la técnica de inmunotransferencia, la cual consiste en correr una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y electrotransferir todas las bandas de proteína a una membrana de nitrocelulosa y detectar la banda correspondiente a PEPC mediante reacción con un anticuerpo específico (58).

6.5.1 Electroforesis desnaturalizante.

La electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, usando un sistema discontinuo (en dos geles de poliacrilamida, con distinto tamaño de poro), según el método de Laemmli (23). Para desnaturalizar a la enzima se adicionó dodecil-sulfato-de sodio (SDS).

Se emplearon dos geles; un gel separador, de 5 cm de longitud y de 7.5 % T (porcentaje total de monómeros acrilamida y bisacrilamida, disuelta en una solución amortiguadora de Tris-HCl de 1.5 M, a pH 8.8), y un gel apilador (colocado sobre el gel separador) de 2 cm de longitud y 4 % T (en Tris-HCl .5 M a pH 6.8). El amortiguador de electrodos fue Tris-HCl .025 M, pH 8.3, conteniendo glicina 0.192 M y SDS 0.1 % (v/v). La duración de

BECKMAN
DU-65 SPECTROPHOTOMETER



COEFFS: F2=0.0000 F1=210.38 F0=-4.936

MEAN: 2.9291E-06
S.D.: 2.8546

FIG. 6 - CURVA PATRON DE PROTEINAS, PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES TOTALES EN EL TEJIDO DE CALLO.

corrida fue de 4 hr a 20 - 25 mAmperes. Ambos geles fueron preparados, mezclando las siguientes soluciones:

Soluciones	Gel separador	Gel apilador
Acrilamida-bisacrilamida (30 x T, 2.7 x C)	5.0 ml	1.34 ml
Amortiguador de separación	5.0 ml	-
Amortiguador apilador	-	2.5 ml
SDS (10 %)	0.100 ml	0.100 ml
Agua destilada	9.86 ml	5.95 ml
*TEMED comercial	0.010 ml	0.0075 ml
*Persulfato de amonio	0.100 ml	0.100 ml
VOLUMEN TOTAL	20.0 ml	10.0 ml

* Antes de adicionar el Temed y el Persulfato de amonio se desgasificó la mezcla, y éstos se adicionaron al momento de aplicarla en la cámara de electroforesis.

6.5.2 Transferencia de proteínas e inmunodetección.

La electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa se llevó a cabo inmediatamente terminada la electroforesis según el método descrito por Towbin et al (58). El gel (de la electroforesis) se lavó con agua bidestilada y se colocó en medio de una cama de filtros humedecidos con las siguientes soluciones:

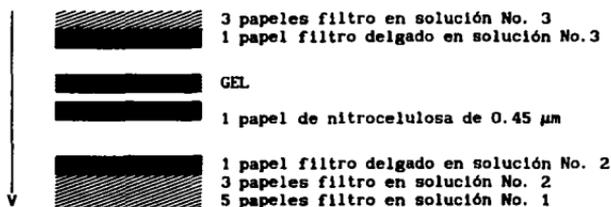
Solución No. 1, anódica. - Tris 0.3 M, pH 10.4
- metanol 20 % (v/v).

Solución No. 2, anódica. - Tris 0.025 M, pH 10.4
- metanol 20 % (v/v).

Solución No. 3, catódica. - ácido β -amino-n-hexano caproico
10 mM, pH 7.2 .
- metanol 20 % (v/v).

El orden de los filtros en la cámara de transferencia queda esquematizado como sigue:

Anodo (+)



Catodo (-)

La transferencia se realizó a 60 mAmp., durante 1 hr.

Una vez realizada la transferencia de proteínas se procedió a revelar el papel de nitrocelulosa. El papel se tñó con rojo de Ponceau a 0.1 %, en 1 % de ácido acético, durante 5 min y se dejó secar, con el fin de comprobar si las bandas de proteína habían sido transferidas.

Ya seco el papel, se lavó con una solución amortiguadora de Tris 0.05 M y NaCl 0.15 M a pH 7.4 (solución TBS base), durante 15 min. con agitación continua.

Después se incubó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación continua, en una solución de saturación con leche descremada Sveltes al 5 % (p/v), Tween 20 al 0.05 % (v/v), en TBS base.

Posteriormente se lavó con la solución de TBS base, durante 15 min. Una vez lavado, se incubó con los anticuerpos (obtenidos en conejo, frente a enzima purificada de PEPC extraída de hoja verde de maíz (3)), diluidas 1:500 (v/v) en solución de saturación. La incubación se realizó en un recipiente cerrado durante 2 hrs a 37°C y con agitación continua.

Se realizaron dos lavados, uno con TBS base y otro con TBS conteniendo 1 M NaCl, ambos de 15 min. de duración. A continuación se incubó durante 2 hrs en agitación continua, a temperatura ambiente con anti-Inmunoglobulina de conejo conjugada con peroxidasa diluida 1:1000 en solución de saturación.

Después de lavar con TBS base durante 15 min., se reveló con el sustrato insoluble de la peroxidasa, que contiene:

4-cloro-1-naftol -----	0.06 % (p/v).
metanol -----	33.33 % (v/v).
agua oxigenada al 30% ----	0.13 % (v/v).

Todo disuelto en TBS base en un volumen total de 16.5 ml.

El producto de la reacción es un precipitado azul, formado sobre la banda de proteínas reconocidas por el anticuerpo, que aparece a los 10 ó 15 min. La reacción se paró con la adición de agua.

6.6 Purificación parcial de la enzima PEPC de callo blanco.

Para la purificación parcial de la enzima PEPC extraída de callo blanco, se indujo un lote del cual se obtuvieron 82 gr de tejido de callo (en peso fresco), al final de la primera resiembra.

Esta cantidad de callo se extrajo en una solución amortiguadora que contenía:

CONTENIDO	CONCENTRACION
Amortiguador de fosfatos de potasio (pH 7.8)	50 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	20 % v/v
• β -mercaptoetanol	10 mM
• PVPP	2 % p/v

• Adicionados inmediatamente antes de la extracción.

El tejido se homogeneizó en un mortero con arena de mar y se filtró a través de una tela de nylon. A continuación se centrifugó a 113,000 g, a 4°C durante 60 min., con el fin de obtener el sobrenadante lo más limpio posible.

De este sobrenadante se tomó una alícuota para la determinación de actividad y la concentración de proteínas.

El resto de la preparación enzimática se aplicó a una columna de intercambio iónico, Sepharosa-Q de flujo rápido (con un volumen de cama de 17 ml, y 2 cm de diámetro por 5.5 cm de altura), previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora usada para la extracción, pero sin PVPP y con un pH de 7.4 .

Una vez aplicada la muestra enzimática a la columna, y después de haberse comprobado que la enzima había quedado retenida o pegada en ésta, se procedió a lavar la columna con la misma solución amortiguadora con la que se equilibró, usando 4 volúmenes de cama, y verificando que en los lavados no se despegara la enzima.

Posteriormente, se prepararon dos soluciones amortiguadoras de

fosfatos a pH 7.4 , a dos concentraciones diferentes, la concentración más baja de 50 mM y la más alta de 300 mM, 40 ml de cada una, para crear el gradiente con el cual se eluyó la enzima pegada a la columna.

La elución se realizó con un flujo de 1.4 ml/min, colectando 15 fracciones de 6 ml cada una. Se midió la actividad a cada fracción.

Para obtener el perfil de proteínas que eluyen de la columna se midió la absorbancia de cada fracción a 280 nm.

Se reunieron las fracciones con actividad de PEPC y se concentraron usando una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel. Para ello, se uso una pequeña columna de DEAE-Sephacel (de 0.75 ml de cama y con un tamaño de 1 cm de diámetro por 1.5 cm de altura), se equilibró con una solución amortiguadora de fosfatos 25 mM a pH 7.3 . A esta columna se aplicó la preparación resultante de reunir las fracciones con actividad de PEPC. Esta se despegó en un solo paso usando una solución amortiguadora de fosfatos 300 mM a pH 7.3 .

Se tomó una alícuota para determinar actividad de PEPC y contenido de proteínas, y el resto de la preparación enzimática se alícuoteó y se guardó a -70°C .

6.7 Inmunoprecipitación de PEPC de callo blanco.

Para realizar la inmunoprecipitación de PEPC, fue necesario purificar parcialmente los anticuerpos anti-PEPC obtenidos frente a PEPC (enzima purificada) extraída de hoja verde de maíz (3).

La purificación parcial de los anticuerpos consistió en una precipitación diferencial con sulfato de amonio, para lo cual se hizo lo siguiente, de acuerdo con el método descrito por Vasquez-Tineo (60).

Se prepararon tres soluciones amortiguadoras;

Solución 1.- Tris-HCl 0.02 mM a pH 8 con EDTA 1 mM

Solución 2.- Tris-HCl 0.02 mM a pH 8 con EDTA 1 mM, saturada con sulfato de amonio.

Solución 3.- Fosfatos de sodio 5 mM a pH 8 .

A 10 ml de suero se le agregaron 6 ml de la solución saturada con sulfato de amonio (sol. 2), la cual se adicionó gota a gota (con pipeta pasteur) a 4 °C y en continua agitación. Una vez adicionado dicho volumen se agitó durante 30 min. y se centrifugó a 8,000 rpm a 4°C, durante 45 min.

El precipitado que se obtuvo, de color blanco con una pequeña capa superficial de color rosa tenue, se resuspendió en 4 ml de solución amortiguadora sin saturar con sulfato de amonio (sol. 1), y nuevamente se procedió a adicionar la solución amortiguadora saturada con sulfato de amonio (sol. 2), en esta ocasión con 2.4 ml de solución, en las mismas condiciones antes señaladas e igualmente se centrifugó a 8,000 rpm, a 4°C, durante 45 min.

El precipitado blanco se resuspendió en 1.5 ml, volumen total de solución amortiguadora de fosfatos de sodio (sol 3), y se dializó durante toda la noche frente a esta misma solución a 4°C con el fin de eliminar todo el sulfato de amonio.

La preparación obtenida (que contenía a la mayor parte de las inmunoglobulinas G) se dividió en alícuotas y se conservó a -70°C para su uso posterior.

Una vez obtenidos los anticuerpos anti-PEPC parcialmente purificados, se procedió a realizar la inmunoprecipitación.

Se usaron dos muestras enzimáticas de PEPC, una de hoja verde de

maíz, enzima purificada, y otra de callo blanco, enzima parcialmente purificada. Después de haber medido la actividad a cada muestra, se incubaron cantidades iguales de actividad de PEPC (0.011 u/ml) tanto de hoja verde como de callo.

La incubación se llevó a cabo con diferentes cantidades de la preparación parcialmente purificada de anticuerpos, anti-PEPC, completando hasta un volumen final de 0.250 ml con una solución salina de fosfato de sodio 50 mM a pH 7.2 que contenía cloruro de sodio 0.85 % (p/v).

Para el experimento control, a la preparación enzimática se le adicionó la solución amortiguadora de fosfatos de sodio sin anticuerpos.

La incubación se realizó a 4°C durante 1 hr y después de este tiempo se centrifugó durante dos minutos en una microfuga. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad residual de PEPC que se expresó como el porcentaje de la actividad enzimática con respecto al control.

6.8 Análisis de datos.

En la investigación bioquímica, específicamente en este tipo de estudios, no se aplican análisis estadísticos como el ANOVA, o comparación de medias.

Sin embargo, con el fin de obtener las constantes cinéticas de la enzima, los datos de velocidad inicial se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max} [s]}{K_m + [s]}$$

en donde v es la velocidad inicial, V_{max} es la velocidad máxima, $[s]$ es la concentración de sustrato variable y K_m es la constante de Michaelis para este sustrato. Los ajustes se hicieron por medio del programan de regresión no lineal ENZFITTER, escrito por Robin J. Leatherbarrow (1987) y Publicado por Elsevier-Biosoft.

VII. RESULTADOS.

7.1 Estudios con callo blanco.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos al principio de este trabajo fue la baja actividad enzimática de PEPC extraída de callo blanco, por lo cual se decidió establecer un lote del cultivo para determinar la curva de crecimiento y conocer el momento en el que se obtendría un mayor peso de callo. Pero también desconocíamos si el aumento de peso del tejido se acompañaba de un aumento en la cantidad de enzima de PEPC en el callo.

Para saber si el aumento del peso fresco del tejido implicaba un aumento en la cantidad de enzima, fue necesario establecer un lote en el cual se inoculara con la misma cantidad de callo a todos los frascos, y después de determinar el peso fresco, determinar la actividad específica de la enzima.

La curva de crecimiento se obtuvo a partir de la segunda resiembra. El inóculo de esta segunda resiembra incluía tanto el tejido de callo como el escutelo del cual provenía el callo, eliminando toda aquella estructura filamentososa o fibrosa, y dejando sólo las partes blandas del callo.

Durante un período de dos semanas el tejido de callo blanco mostró un escaso aumento de peso fresco en relación con el inicial del inóculo. Este crecimiento fue tan sólo del 17 % (Fig. 7).

Por otra parte, los resultados de peso seco mostraron que no hubo crecimiento real lo que nos induce a pensar que sólo hubo una hidratación del tejido (Fig. 7).

7.1.1 Actividad específica de PEPC durante el crecimiento del callo

La determinación de la actividad específica (μg de proteínas) se

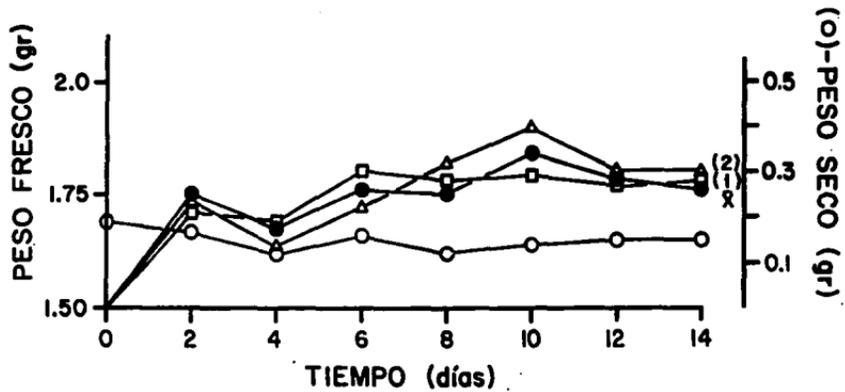


Fig. 7 - CRECIMIENTO DE CALLO BLANCO DE MAIZ, A PARTIR DE LA SEGUNDA RESIEMBRA.

realizó para cada punto de la curva de crecimiento, para lo cual se extraía la enzima de cada muestra obtenida y se determinaba tanto la actividad como la concentración total de proteínas solubles.

El comportamiento de la concentración total de proteínas solubles como el de la actividad específica, fue similar al comportamiento del crecimiento del callo (Fig. 8), es decir, no hubo cambios significativos a lo largo del periodo en que se hicieron estas determinaciones.

En vista de estos resultados, y puesto que establecer las condiciones óptimas de crecimiento del callo estaba fuera de las intenciones de este trabajo, se decidió realizar la cosecha del callo al final de la primera resiembra, lo que nos ahorra un tiempo considerable en la obtención de la enzima.

7.1.2 Purificación parcial de PEPC.

Para poder caracterizar la enzima de callo blanco era necesario en primer lugar saber si existían una o más isoenzimas de PEPC en este tejido.

Con este fin se procedió a purificar parcialmente la actividad de PEPC empleando técnicas cromatográficas.

La extracción de la enzima se realizó con una solución amortiguadora de 0.05 M de fosfatos, para así poder aplicar el extracto crudo (tras un centrifugado) directamente a la columna cromatográfica de intercambio iónico, Sepharosa-Q de flujo rápido.

La centrifugación se realizó a 113,000 g., durante 60 min. para poder obtener un extracto crudo lo más limpio posible. La primera cromatografía de intercambio iónico mostró un único pico de actividad PEPC, indicando que sólo existía una sola isoenzima en este tejido. Se reunieron las fracciones con mayor actividad de este pico y tras disminuir su

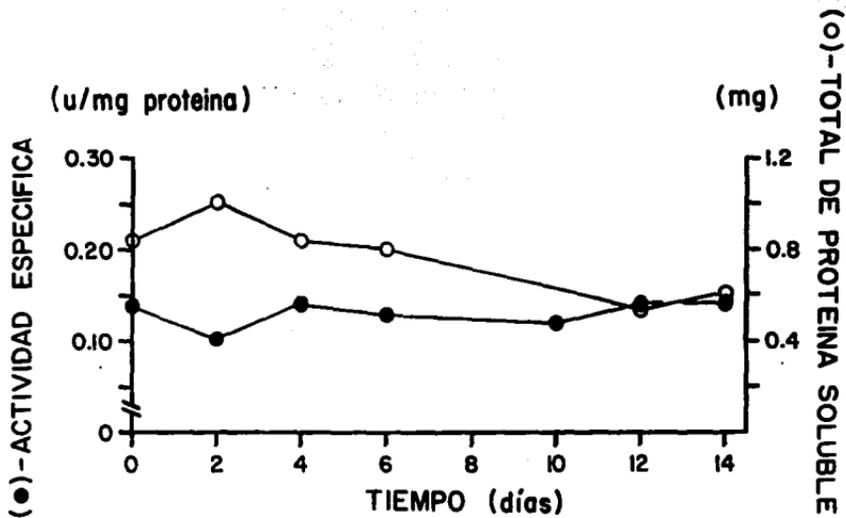


Fig. 8 - ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PEPC DE CALLO BLANCO DE MAIZ,
DURANTE EL CRECIMIENTO DEL TEJIDO.

concentración de sales por dilución con el amortiguador de pegado a la columna, se aplicaron a una nueva columna de Sepharosa-Q.

Se realizaron dos cromatografías consecutivas de intercambio iónico, con el fin de asegurarnos de que sólo existía una isoenzima y de lograr una mejor purificación de ésta.

En la Fig. 9 se muestra el perfil de elución de la segunda cromatografía de Sepharosa-Q, donde se puede observar un único pico de actividad de PEPC, lo que demuestra que en el callo blanco está presente una sola isoenzima de PEPC.

La fuerza iónica con la que eluyó la proteína de PEPC fue de 185 a 215 mM de fosfatos (ver Fig. 9), mientras que la PEPC de hoja verde eluye a una fuerza iónica de 160 a 180 mM de fosfatos (datos obtenidos en el laboratorio). Por tanto el grado de retención en esta columna de la isoenzima de callo es mayor que el de la isoenzima fotosintética, lo que fuertemente sugiere que se trata de isoenzimas diferentes.

Los datos de esta purificación se presentan en la Tabla III.

Tabla III. PURIFICACION PARCIAL DE PEPC DE CALLO BLANCO

Pasos	Volumen (ml)	Actividad (u totales)	Prot.Total (mg)	Activ. esp. (u/mgprot)	Veces de purif.	Rendimiento (%)
Ext. crudo ¹	85	7.19	50.33	0.1428	1.0	100
Seph. Q ²	160	6.01	7.58	0.7921	5.5	83.5
Seph. Q ²	1.6	1.25	0.28	4.4885	31.4	17.3

1. Extracto crudo
2. Sepharosa-Q

El cuadro de purificación muestra que el extracto crudo (con una

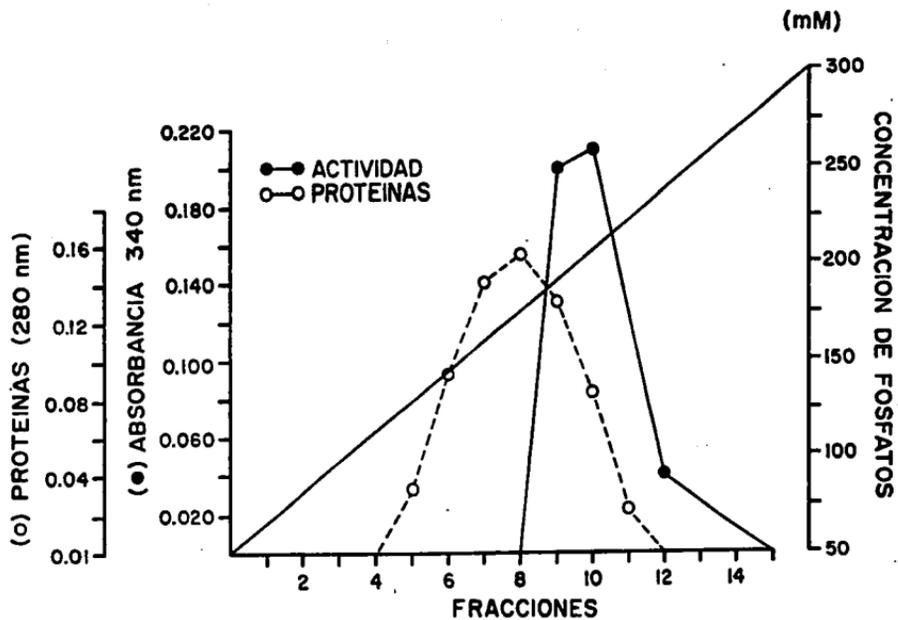


Fig: 9 - PERFIL DE ELUCION DE PEPc DE CALLO BLANCO,
 DE UNA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHAROSA-Q.

actividad de 0.14 unidades/mg de proteína) fue purificado 31.4 veces, después del segundo paso por Sepharosa-Q.

7.1.3 Propiedades cinéticas de PEPC.

La caracterización de una enzima necesariamente debe incluir el estudio de su comportamiento como catalizador, es decir, estudios cinéticos que consisten en determinar la dependencia de la concentración del sustrato y de efectores de la velocidad de reacción.

7.1.3.1 Cinética de saturación por PEP-Mg.

La curva de saturación por el sustrato PEP-Mg se determinó a un pH de 7.3, a 30°C, y a una concentración fija de Mg^{2+} libre, 1 mM. La concentración de HCO_3^- se mantuvo saturante (10 mM). Para estos estudios se usó la preparación de enzima parcialmente purificada por cromatografía de intercambio iónico. Se encontró que la isoenzima de callo blanco sigue una cinética de saturación por PEP-Mg michaeliana con una alta afinidad por su sustrato PEP-Mg, siendo la K_m para este sustrato de $22.8 \pm 2.1 \mu M$ (Fig. 10).

7.1.3.2 Respuesta de la actividad de PEPC a efectores.

Las enzimas alostéricas presentan un sitio catalítico (sitio activo) y uno (o varios) sitio(s) regulador(es), a los cuales pueden unirse moléculas (ligandos) y modificar la actividad de la enzima. Estas modificaciones pueden tener efectos tanto de activación como de inhibición.

Los efectores de la actividad PEPC que se estudiaron en este trabajo fueron el inhibidor L-malato y el activador glucosa-6-fosfato. La respuesta de la enzima a estos efectores se determinó a pH 7.3, y a concentraciones saturantes tanto de HCO_3^- (10 mM), como de PEP (de 2 a 5 mM) y de Mg^{2+} (10 mM).

SATURACION POR PEP-Mg DE PEPC DE CALLO BLANCO DE MAIZ.

Michaelis Menten kinetics
Simple weighting

Variable	Value	Std. Err.
k cat	6.82424E-02	1.47538E-03
Km	2.27822E-02	2.07207E-03

	[PEP-Mg] mM	Actividad (u/ml)	Calculated
1	6.90000E-03	1.80000E-02	1.58638E-02
2	6.90000E-03	1.80000E-02	1.58638E-02
3	1.39000E-02	2.70000E-02	2.58591E-02
4	1.39000E-02	3.20000E-02	2.58591E-02
5	2.78000E-02	3.70000E-02	3.75060E-02
6	2.78000E-02	3.70000E-02	3.75060E-02
7	4.17000E-02	4.30000E-02	4.41317E-02
8	4.17000E-02	4.10000E-02	4.41317E-02
9	6.96000E-02	4.90000E-02	5.14133E-02
10	6.96000E-02	4.60000E-02	5.14133E-02
11	1.04400E-01	5.40000E-02	5.60181E-02
12	1.04400E-01	5.60000E-02	5.60181E-02
13	2.08900E-01	6.30000E-02	6.15319E-02
14	2.08900E-01	6.50000E-02	6.15319E-02
15	4.17800E-01	6.80000E-02	6.47137E-02
16	4.17800E-01	6.00000E-02	6.47137E-02
17	8.35700E-01	7.00000E-02	6.64314E-02
18	8.35700E-01	6.70000E-02	6.64314E-02

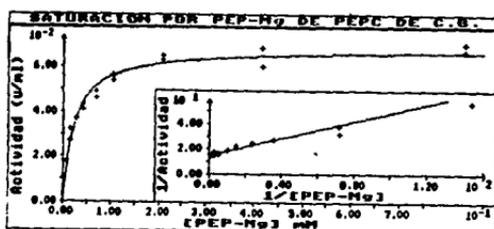


FIG. 10 - CINETICA DE SATURACION POR PEP-Mg, DE PEPC DE CALLO BLANCO DE MAIZ, A PH 7.3, Mg LIBRE 1 mM, Y HCO₃ 10 mM.
RECUADRO: REGRAFICO DE DOBLES RECIPROSOS.

PEPC de callo blanco fue inhibida por L-malato 5 mM en un 21 % , y mientras que Glu-6-P 5 mM activó un 20 % .

Se ha reportado en la bibliografía que el efecto que tienen estos metabolitos sobre la enzima *PEPC* de hoja verde, (enzima fotosintética) es mayor, Glu-6-P ha llegado a activar a ésta enzima hasta un 300 % (véase antecedentes 2.1.7.1) (7).

7.2 Estudios con callo enverdecido.

7.2.1 Actividad específica de *PEPC*.

Los tratamientos que se emplearon para el enverdecimiento del callo se describen en Métodos.

La actividad específica de *PEPC* de extracto crudo de callo enverdecido de los diferentes tratamientos se muestra en la Tabla IV, donde se incluyen con fines comparativos los datos de callo blanco (antes de someterlos a los tratamientos de enverdecimiento) y los de hoja verde. En todos los casos se usaron extractos crudos para estas determinaciones.

Como puede observarse en la Tabla IV, la actividad específica de *PEPC* extraída de los callos verdes que fueron sometidos a tratamientos con CO₂ fue superior a la actividad específica de callo blanco. El tratamiento con almidón (MEA) y CO₂ rindió un tejido con aumento de actividad del 111 %, mientras que el aumento obtenido tras el tratamiento con glucosa (MEG) y CO₂ fue del 60 % , ambos con respecto a la actividad del callo blanco. Cabe señalar que por problemas técnicos no se obtuvo material de callo enverdecido con almidón sin CO₂.

Pese a estos aumentos de actividad, no se alcanzó el nivel de actividad específica de *PEPC* de hoja verde.

Tabla IV. ACTIVIDAD ESPECIFICA EN EXTRACTOS CRUDOS DE LA
ENZIMA PEPC DE DIFERENTES TEJIDOS DE MAIZ.

TIPO DE TEJIDO ^o	TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ^{oo} (u / mg prot.)
Callo blanco	---	0.109
Callo verde	MEG, ^{***} con CO ₂	0.175
Callo verde	MEA, ^{***} con CO ₂	0.230
Callo verde	MEG, sin CO ₂	0.106
Hoja verde ¹	---	1.398

^o Extracción como se describe en Métodos, con la excepción de hoja verde que se usó una relación de 2:1 de volumen de amortiguador por peso fresco de tejido.

^{oo} La actividad específica se determinó a pH 7.3 y a 30°C, bajo las condiciones que se describen en Métodos.

^{***} MEG y MEA: medio de enverdecimiento con glucosa y con almidón, respectivamente.

¹ Este dato está en términos comparativos.

7.2.2 Propiedades cinéticas de PEPC.

7.2.2.1 Cinética de saturación por PEP-Mg.

En este caso, los estudios cinéticos se realizaron con extracto crudo, dado que no disponíamos de suficiente tejido para poder hacer una purificación parcial de callo enverdecido. Usamos como material el callo obtenido tras el tratamiento con MEA y CO₂, puesto que fue el que mayor actividad de PEPC presentó.

La cinética de saturación por el sustrato PEP-Mg de PEPC de este callo enverdecido también mostró un comportamiento michaeliano (Fig. 11), como en el caso de callo blanco. Si bien es cierto que en este caso el valor de K_m obtenido de 75 ± 1.2 μM (Fig. 11), fue casi tres veces superior

SATURACION POR PEP-Mg DE PEPC DE CALLO VERDE DE MAIZ.

Michaelis Menten kinetics
Simple weighting

Variable	Value	Std. Err.
k cat	3.99777E-01	1.33228E-02
Km	7.49515E-02	1.22037E-02

	[PEP-Mg] mM	Actividad (u/ml)	Calculated
1	6.96000E-02	1.80000E-01	1.92488E-01
2	1.04400E-01	2.57200E-01	2.32709E-01
3	2.08900E-01	2.70000E-01	2.94215E-01
4	4.17800E-01	3.47200E-01	3.38967E-01
5	8.35700E-01	3.60100E-01	3.66873E-01
6	8.35700E-01	3.85800E-01	3.66873E-01
7	5.57410E+00	3.85800E-01	3.94472E-01

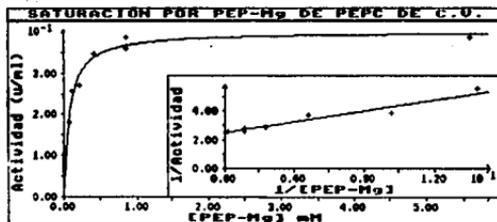


Fig. 11 - CINETICA DE SATURACION POR PEP-Mg, DE PEPC DE CALLO ENVERDECIDO DE MAIZ, A PH 7.3, Mg LIBRE 1mM, Y HCO₃ 10 mM.
RECUADRO: REGRAFICO DE DOBLES RECIPROCOS.

al obtenido en callo blanco. Estas determinaciones se llevaron a cabo a concentración fija de Mg libre 1 mM, HCO₃ 10 mM, pH 7.3 y a 30°C como se indica en Métodos.

7.2.2.2 Respuesta de la actividad de PEPC a efectores.

Para el callo enverdecido, también se determinó la respuesta de la enzima a los efectores L-malato y Glu-6-P.

Malato a una concentración de 5 mM inhibió el 41 % de la actividad de PEPC, siendo esta inhibición casi el doble de la que ejerce sobre la enzima extraída de callo blanco.

Pero Glu-6-P 5 mM la activó sólo un 13 %, valor ligeramente inferior al obtenido en los estudios con callo blanco.

7.3 Estudios inmunológicos.

7.3.1 Inmunodetección de PEPC.

Para la cuantificación de la proteína PEPC se empleó la técnica de inmunodetección por Western blot, que implica el uso de la electroforesis y de la electrotransferencia. Para la inmunodetección se emplearon anticuerpos obtenidos en conejo frente a PEPC de hoja verde de maíz.

En la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE se corrieron con fines comparativos extractos crudos de callo blanco, callo verde y de hoja verde de maíz, usándose 10 µg de proteína total soluble por carril (como se describe en Métodos).

Tras revelar el filtro de nitrocelulosa apareció una fuerte banda de PEPC en el carril correspondiente a hoja verde, otra banda clara, si bien no tan intensa, en el carril correspondiente a callo verde, mientras que en el carril correspondiente a la muestra del callo blanco no apareció ninguna

banda (Fig. 12).

Como puede observarse en la Fig. 12 el peso molecular de la subunidad de la enzima *PEPC* de callo verde es el mismo que el de la subunidad de la enzima de hoja verde, si bien el tamaño de la banda fue mucho mayor en el caso de la hoja verde, lo que demuestra la presencia de una menor cantidad de proteína *PEPC* en callo enverdecido que en hoja.

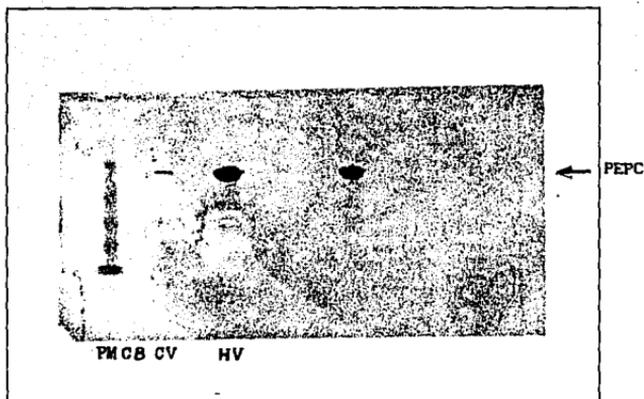
Por otra parte, puesto que en todos los carriles se aplicó la misma cantidad de proteínas solubles, la ausencia de la banda en el carril del callo blanco podría deberse a: (1) que el tejido de callo contenga una menor cantidad de proteína *PEPC* en relación al total de proteína soluble que los otros tejidos, o (2) que el suero anti-*PEPC* obtenido frente a la enzima de hoja verde (es decir frente a la isoenzima fotosintética) no reconociera a la enzima de callo blanco, que como se demostró anteriormente es una isoenzima diferente.

Por tal motivo era necesario saber si el antisuero reconocía o no a la isoenzima del callo blanco, para lo cual se realizó una inmunoprecipitación.

7.3.2 Inmunoprecipitación de *PEPC* en extractos crudos.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo usando volúmenes de extractos crudos que contenían valores iguales de actividad *PEPC* (en unidades/ml) tanto de tejido de callo blanco como de hoja verde (usando éste como control).

Se adicionaron volúmenes crecientes de la preparación de anticuerpos, incubándose durante 1 hr y determinando la actividad residual de las muestras enzimáticas tras este periodo de incubación (véase Métodos 6.7 para los detalles experimentales).



PM: Proteínas marcadoras de peso molecular.

CB: Extracto crudo de callo blanco.

CV: Extracto crudo de callo enverdecido.

HV: Extracto crudo de hoja verde

A cada carril se aplicaron 10 ug de proteína soluble total.

La flecha indica la posición donde se encuentra la subunidad de PEPC

FIG. 12 - DETECCIÓN DE LA ENZIMA PEPC DE CALLO BLANCO, CALLO ENVERDECIDO Y HOJA VERDE DE MAIZ, POR EL METODO DE ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS "WESTERN BLOT".

En la Fig. 13, se muestra la gráfica de inmunoprecipitación de PEPC tanto de callo blanco como la de hoja verde. Se observa que mientras la enzima extraída de hoja verde precipitaba casi el 100 % de su actividad con 40 μ l de antisuero de la preparación anti-PEPC, la enzima de callo blanco sólo llegó a precipitar un 75 % con ese mismo volumen. Ello demuestra que el anticuerpo anti-PEPC obtenido frente a enzima de hoja verde sí reconoce (aunque parcialmente), a la isoforma de PEPC de callo blanco.

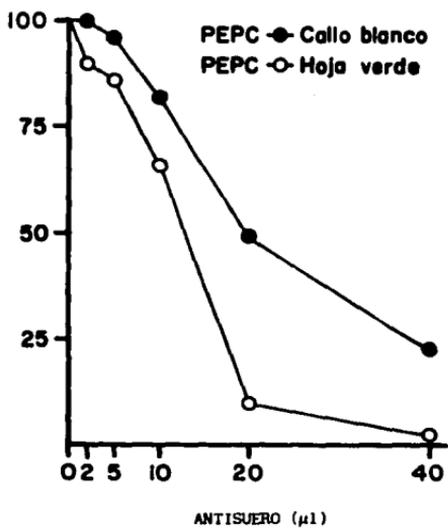


FIG. 13 - INMUNOPRECIPITACION DE PEPC DE CALLO BLANCO Y DE HOJA VERDE DE MAIZ.

VIII. DISCUSION.

8.1 Obtención de callos.

Con respecto al cultivo de tejidos de callo blanco no logramos un buen crecimiento del tejido, debido a que para éste tipo de plantas (monocotiledóneas) no se ha establecido realmente un método adecuado hasta la fecha (68), si bien, hay reportes que establecen al medio M-S modificado como un medio adecuado para la producción de callo de maíz (30,58,61,32).

Las causas por las cuales el tejido de callo no presentó un crecimiento significativo pueden ser varias, entre las que destacan:

- La acumulación de metabolitos en el medio del cultivo de resiembras, acarreado en las partes del tejido que estuvieron en contacto con el medio de cultivo anterior, y que alteraron las concentraciones de los medios de cultivo frescos.

- El que en el momento de la resiembra el callo no se encontrara en la fase de crecimiento estacionario, sino en la fase de crecimiento exponencial y que al ser removido se alterara su metabolismo, el cual se desfazaría en la subsecuente resiembra.

- El que el tejido del callo estuviera contaminado con algún virus que imposibilitara su crecimiento (68).

Puesto que el objetivo de este trabajo no era la prueba de metodología para el crecimiento óptimo del callo, sino la caracterización de la enzima PEPC presente en este tejido, decidimos usar el callo obtenido en la primera resiembra, lo que nos permitía acortar el tiempo de manipulación del tejido y poder usar más cantidad de material para la obtención de la enzima.

Sin embargo, es importante señalar que una gran parte del tiempo

empleado en este trabajo se dedicó al entrenamiento en técnicas de cultivo de tejidos vegetales, por considerarlas de gran interés para mi formación.

8.2 Caracterización de PEPC.

Como paso previo a la caracterización de la enzima PEPC presente en callo era necesario comprobar si existían una o más isoformas y, en caso de haber más de una, separarlas para poder asignar las características cinéticas y/o moleculares encontradas a cada una de ellas. Por ello, en estos estudios no se usaron extractos crudos, sino que se procedió a una purificación parcial de la enzima.

Puesto que la mayoría de las isoenzimas de PEPC conocidas hasta la fecha difieren fundamentalmente en su carga superficial y muy poco en su peso molecular (74), decidimos usar estas diferencias para separarlas por cromatografía de intercambio iónico. Al mismo tiempo, su comportamiento en esta cromatografía nos permitiría definir el tipo de isoenzima (anaplerótica o fotosintética) por comparación con los datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio para la isoenzima fotosintética de hoja verde y para la isoenzima anaplerótica de hoja etiolada, ambas de maíz (60).

En la cromatografía realizada en la columna de intercambio iónico, Q-Sepharosa, la elución de la actividad de PEPC, nos mostró la presencia de una sola isoenzima para el caso de callo blanco (Fig. 9).

Desafortunadamente, por la escasez de material biológico del callo enverdecido, no se pudo realizar una cromatografía en este último caso para determinar la presencia de una o varias isoenzimas en este tipo de callo. La fuerza iónica con la que eluyó la enzima de callo blanco (185 a 215 mM de fosfatos, Fig. 9), difiere claramente de la fuerza iónica con la

que eluye la enzima extraída de hoja verde (160 a 180 mM de fosfatos), bajo las mismas condiciones cromatográficas, mientras que coincide con la fuerza iónica a la que eluye la isoforma anaplerótica de hoja etiolada (60).

Ello es indicador de que la enzima PEPC de callo blanco tiene una mayor carga positiva superficial, por lo cual se une a la resina de intercambio iónico con mayor fuerza que la forma fotosintética y se requiere una mayor molaridad de fosfatos para despegarla.

Por tanto, concluimos que en callo blanco existe solo una isoforma de PEPC y que ésta es del tipo anaplerótico.

En cuanto a las propiedades cinéticas de esta isoenzima, su alta afinidad por el sustrato PEP-Mg reflejada en su baja K_m , la ausencia de cooperatividad positiva a pH 7.3, su baja respuesta a inhibidores y activadores de la isoforma fotosintética, constituyen evidencias adicionales de que esta isoenzima no es la fotosintética sino la anaplerótica, reforzando así nuestra conclusión previa basada en las características moleculares de esta isoenzima.

Por otro lado las características de la isoenzima de callo enverdecido difieren de las de PEPC de callo blanco.

La actividad específica (μ /mg de proteína) se ve incrementa al doble con el enverdecimiento del callo blanco el inhibidor L-malato aumenta al doble su efecto sobre la actividad de PEPC de callo enverdecido; en la cuantificación de proteína PEPC por Western blot aparece una mayor cantidad de proteína PEPC en callo enverdecido que en callo blanco (ya que en callo blanco no apareció ninguna banda y el anti-PEPC usado sí reconoce, aunque parcialmente, a PEPC de callo blanco); la K_m (PEP-Mg) de callo enverdecido fue tres veces mayor que la K_m de callo blanco, lo que muestra que la isoforma de callo enverdecido tiene una menor afinidad por el

sustrato PEP-Mg que PEPC de callo blanco.

Sin embargo, con respecto al valor de la K_m de callo enverdecido, este valor es muy inferior al valor de la K_m (PEP-Mg) encontrado bajo las mismas condiciones de ensayo para PEPC de hoja verde, que es de 1.7 mM.

Las características cinéticas de PEPC de callo enverdecido, pese a que sus constantes cinéticas son diferentes a las de PEPC de callo blanco, son también muy diferentes a las de la isoforma fotosintética de hoja, lo que sugiere que en este tejido de callo enverdecido (pero no verde completamente) empieza a aparecer la isoforma fotosintética, que se refleja en un incremento de la K_m (PEP-Mg), pero aún sigue siendo mayoritaria la forma anaplerótica propia de tejidos no fotosintéticos.

Creemos, por tanto, muy probable que de lograrse un mayor grado de enverdecimiento del callo, para lo cual obviamente se requieren mucho más estudios sobre las condiciones que inducen al enverdecimiento, la isoenzima predominante podría detectarse si es la fotosintética.

Los resultados obtenidos en este trabajo, si bien no definitivos, si son muy prometedores, puesto que validan el uso de cultivo de tejidos para el estudio de los cambios en la maquinaria enzimática de las células que acompañan a los procesos de enverdecimiento y abren el camino para estudios posteriores.

8.3 Quantificación de PEPC.

La determinación de la cantidad de una enzima conocida en un tejido necesariamente ha de llevarse en extractos crudos, que no hayan sido sometidos a ningún paso de purificación, porque estas manipulaciones siempre conllevan pérdidas de la enzima.

En este trabajo nos propusimos como objetivo determinar los cambios

no sólo de actividad, sino también en cantidad de la(s) isoforma(s) que encontráramos en callo blanco en respuesta a condiciones ambientales que indujeran al enverdecimiento. Pensamos que la determinación de cambios cuantitativos es muy importante, porque pudiera suceder que apareciera la isoenzima fotosintética en forma inactiva y por tanto no fuera detectada en los estudios en las que se investigó cambios en la actividad de la enzima.

Los métodos actualmente usados en bioquímica para detectar específicamente y cuantificar en forma relativa a una determinada enzima son métodos inmunológicos, que hacen uso de anticuerpos específicos obtenidos contra esta enzima y del color que aparece después de tratar los complejos antígeno-anticuerpo formados con un anti-Ig que lleva acoplado una segunda enzima que produce un compuesto coloreado (58).

Dos son las técnicas de uso general: manchado puntual (Dot blot) que brevemente consiste en evaluar la intensidad de la mancha que aparece en pocillos a los que se ha aplicado cantidades fijas de extractos crudos conteniendo la enzima en estudio; e inmunotransferencia (Western blot) que permite evaluar la intensidad de la mancha en la(s) banda(s) de proteína(s) después de haber hecho una separación electroforética de las proteínas del extracto crudo y haberlas transferido a un filtro de nitrocelulosa.

A pesar de que esta última técnica es mucho más compleja que la primera, y por ello mucho más difícil de realizar, fue la elegida para este trabajo fundamentalmente por dos razones: 1^a) Es mucho más resolutive que el Dot blot, ya que de existir varias isoformas de la enzima que crucen con los anticuerpos y que difieran en su movilidad electroforética se pueden detectar y cuantificar por separado. Este punto era especialmente importante en nuestro estudio, puesto que tratábamos de investigar si aparecía o no la isoenzima fotosintética al enverdecer el callo; y 2^a) La

aplicación de esta metodología implica el entrenamiento y manejo de técnicas electroforéticas que son hoy en día muy importantes para cualquier tipo de trabajo que implique biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), por lo que era de gran interés la formación obtenida en este aspecto metodológico.

Como se puede observar en la Fig 12, el carril que corresponde al extracto crudo de callo blanco no presenta ninguna banda en el filtro revelado, y además la diferente proporción entre las bandas de callo enverdecido y la de hoja verde apuntan hacia una escasez de proteína PEPC en los tejidos de callo. Sin embargo pudiera ser que la enzima de callo blanco no hubiera sido reconocida por el anticuerpo anti-PEPC de hoja verde. Por ello se procedió a evaluar el grado de reconocimiento que este anticuerpo tenía sobre la isoforma anaplerótica de callo blanco por medio de inunoprecipitación de la actividad enzimática. Pero después de la inunoprecipitación, tanto de la enzima PEPC de callo blanco como de PEPC de hoja verde, se confirmó que la ausencia de la banda se debió a la baja cantidad de proteínas de PEPC en el tejido del callo blanco.

Por esta técnica encontramos que la isoenzima de callo blanco y de hoja verde muestran identidad parcial frente a anti-IgG de PEPC de hoja verde, es decir, si hubo reacción cruzada de la isoenzima de callo blanco con el anticuerpo obtenido frente a la isoforma de hoja verde, aunque, como era de esperarse, el reconocimiento no es total.

Estos resultados nos están indicando que efectivamente la cantidad relativa de proteína PEPC presente en callo es muy inferior a la presente en hoja verde.

Un resultado hasta cierto punto sorprendente y muy interesante fue el de callo enverdecido, que presentó una considerablemente mayor cantidad

de proteína de PEPC que el callo blanco (fig 12). Puesto que esta mayor cantidad de enzima no corresponde al incremento de actividad específica encontrado (Tabla IV), este resultado prácticamente sugiere que una proporción de la enzima presente en callo enverdecido esté inactiva.

El interés de estos resultados estriba en las preguntas que se plantean sobre la regulación de la actividad de la isoenzima fotosintética. Así, pareciera que el enverdecimiento conlleva la aparición de esta isoenzima, pero que ésta está mayoritariamente en forma inactiva, probablemente ya no habría sido correctamente procesada postraduccionalmente. Es decir, se induce la síntesis del polipéptido, pero el callo parcialmente enverdecido parece carecer de algún o algunos mecanismos que hacen que este polipéptido tenga actividad enzimática. Ello implica que la enzima sintetizada en respuesta a condiciones que inducen enverdecimiento requiere para ser activada estar sujeta a una o varias modificaciones postraduccionales, lo cual no había sido detectado en hoja.

El estudio de la naturaleza de estas modificaciones postraduccionales y su relevancia como mecanismo de control en el establecimiento de la autotrofia abre una muy interesante línea de investigación.

IX. CONCLUSIONES.

Las conclusiones a las que llegamos en este trabajo sobre las características de las enzimas presentes en callo blanco y enverdecido de maíz se podrían enlistar de la siguiente manera:

1) En callo blanco existe una isoenzima PEPC diferente a la presente en hoja verde.

2) La isoenzima de callo blanco tiene características semejantes a la isoenzima anaplerótica de plantas C₄ y CAM, por lo que concluimos que es una isoenzima anaplerótica.

3) En el tejido de callo enverdecido parece existir una mezcla de las dos isoenzimas, la de callo blanco y la de hoja verde.

4) Posiblemente el callo enverdecido contenga una cantidad apreciable de proteína PEPC de la forma fotosintética, pero en forma inactiva.

5) Para la aparición de una isoenzima fotosintética activa parece requerirse no sólo de la síntesis del polipéptido, sino de modificaciones postraduccionales que la activen.

A P E N D I C E

TABLA I.-SOLUCIONES STOCK DEL MEDIO DE CULTIVO
MURASHIGE-SKOOG (M-S) (33).

Soluciones	Composición	(g/l)
A	CaCl ₂ 2H ₂ O	44.0
B	NH ₄ NO ₃	16.5
	KNO ₃	19.0
C	KI	0.083
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0025
D	KH ₂ PO ₄	17.0
	H ₃ BO ₃	0.62
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
E	MgSO ₄ 7H ₂ O	37.0
	MnSO ₄ H ₂ O	1.8914
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0025
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.86
F	FeSO ₄ 7H ₂ O	2.784
	EDTA-Na 2H ₂ O	3.726
G	Inositol	10.0
H	Ac Nicotínico	0.1
I	Tiamina-HCl	0.2
J	Piridoxina-HCl	0.1
K	Glicina	1.0

TABLA II.- PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO R₂ Y R₄

SOLUCION STOCK	MEDIO M-S	MEDIO R ₂	MEDIO R ₄
	(CANTIDAD SUFICIENTE PARA UN LITRO)		
A	10 ml	10 ml	10 ml
B	100 ml	50 ml	50 ml
C	10 ml	10 ml	10 ml
D	10 ml	10 ml	10 ml
E	10 ml	10 ml	10 ml
F	10 ml	10 ml	10 ml
G	10 ml	10 ml	10 ml
H	5 ml	5 ml	5 ml
I	0.5 ml	5 ml	5 ml
J	5 ml	5 ml	5 ml
K	2 ml	2 ml	2 ml
Casefna	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Cinetina	0.01 mg	0.01 mg	—
MCP		0.002 g	0.004 g
Fitagel		2.5 g	2.5 g
pH		5.8	5.8

X. BIBLIOGRAFIA.

1. Atkins, C.A., Kuo, J., Pate, J.S., Flinn, A.M. y Steele, T.W. (1977). Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **80**: 779-786.
2. Bandurski, R.S. (1955). Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **217**: 137-150.
3. Bouchan-Callix, A.L., Mújica-Jiménez, C., Molina-Galán, J.D. and Muñoz-Clares, R.A., (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme in leaves of two populations of maize differing in grain yield. *J. Plant Physiol.* vol. **143**: 15-20.
4. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
5. Chisteller, J.T., Laima, W.A. y Sutton, W.D. (1977). Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol.* **60**: 47-50.
6. Danner, J. y Ting, I.P. (1967). CO₂ Metabolism in corn roots: II. Intracellular distribution of enzymes. *Plant Physiol.* **42**: 719-724.
7. Deléens, E. y Brulfert, J. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiol. Veg.* **21(5)**: 827-834.
8. Dennis, D.T. y Turpin, D.H. (1990). *Plant Physiology, Biochemistry*

- and Molecular Biology. Ed. Longman Scientific and technical. England. pp 275-298.
9. Dokin, M.E., Taffs, J. y Martin, E.S. (1982). A study of the in-vitro regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the epidermis of *Commelina communis* by malate and glucose-6-phosphate. *Planta* 155: 416-422.
 10. Esau, K. (1965). *Planta Anatomy*. Ed. Omega. 2^a edición, Barcelona, España, pp 700 y 703.
 11. Goatly, M.B. y Smith, H. (1974). Differential properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from etiolated and green *Sugar cane*. *Planta* 117: 67-73.
 12. Hatch, M.D. y Slack, D.R. (1966). Photosynthesis by *Sugar-cane* leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation *Biochem. J.* 101: 103-111.
 13. Hayakawa, S., Matsunaga, K. y Sugiyama, T. (1981). Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* 67: 133-138.
 14. Iglesias, A.A., Gonzáles, D.H. y Andreo, C.S. (1984). Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by modification with phenylglyoxal. *Biochem. et Biophys. Acta.* 788: 41-47.
 15. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984). Involvement of thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosyn. Research* 5: 215-226.
 16. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1989). Purification of NADP-malic enzyme and phosphoenolpyruvate carboxylase from sugar cane leaves. *Plant Cell Physiol.* 30(3): 399-405.

17. Jacobson, L. (1955). Carbo dioxide fixation and ion absorption in barley roots. *Plant Physiol.* 30: 264-269.
18. Jackson, W.A. y Coleman, H.T. (1959) Fixation of carbon dioxide by plants roots through phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Sci.* 11: 1-16.
19. Jiao, J.A. y Chollet, R. (1989). Regulatory seryl-phosphorylation of a C₄ PEPC by a soluble protein Kinase from maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 269(2): 526-535.
20. Jones, R., Wilkings, M.D., Coggins, J.R., Fewson, C.A. y Malcolm, A.D.B. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxylase from the crassulacean plant *Bryophyllum fedtschenkoi*, Hamet et Perrier. *Biochem. J.* 175: 391-406.
21. Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1983). Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* and other C₄ plants. *Plant Physiol.* 73: 735-739.
22. Kennedy, R.A. y Barnes, J.E. (1977). Photosynthesis in C₄ plant tissue cultures: Significance of kranz anatomy to C₄ acid metabolism in C₄ plants. *Plant Physiol.* 59: 600-603.
23. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685.
24. Lavergne, D., Nato, A., Dupuis, J.-M., Péan, M. y Chagvardieff, P. (1992). Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C₃-photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea mays*. *Physiol. Plant* 84: 292-300.
25. Mares, J. y Leblová, S. (1980). Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica* 14(1):

26. Maruyama, H., Easterday, R.L., Chang, H.-C. y Lane, M.D. (1966). The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate: I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **241(10)**: 2405-2412.
27. McClure, P.R., Cooker, G.T.I. y Schubert, K.R. (1983). Carbon dioxide fixation in roots and nodules of *Ainus glutinosa*. I. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonyl phosphate synthetase in dark CO₂ fixation, citrulline synthesis and N₂ fixation. *Plant Physiol.* **71**: 652-657.
28. Meyer, C.R., Rustin, P. y Wedding, R.T. (1989). A kinetic study of the effects of phosphate and organic phosphate on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **271(1)**: 84-97
29. Miziorko, H.M., Mowak, T. y Mildam, A.S. (1974). Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification, properties and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 378-379.
30. Mukerji, S.K. y Ting, I.P. (1971). Phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes: separation and properties of three forms from cotton leaf tissue. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **143**: 297-317.
31. Mukerji, S.K. (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification and properties of two isoenzymes. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **182**: 343-351.
32. Mukerji, S.K. (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Inhibition of CO₂ fixation by SO₃²⁻ and activation by glucose-6-phosphate. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **182**:

33. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for reapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. plant.* 15: 473-479.
34. Nato, A. y Mathieu, Y. (1978). Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-biphosphate carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* (CV XANTHI) cell suspensions. *Plant. Science Letters.* 13: 49-56.
35. Nato, A., Mathieu, Y. y Brangeon, J. (1981). Heterotrophic tobacco cell cultures during greening: II. Physiological and biochemical aspects. *Physiol. Plant.* 53: 335-341.
36. Nato, A. y Vidal, J. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in relation to physiological processes during the growth of cell suspension cultures from *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Veg.* 21(5): 1031-1039.
37. Neumann, K.H. y Bender, L. (1987). Photosynthesis in cell and tissue culture systems. Proceeding the 6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Ed. Alan, R., Liss, Inc. USA. *Plant tissue and Cell Culture* pp 151-165.
38. O'Leary, M.H., Rife, J.E. y Slater, J.D. (1981). Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem.* 20: 7308-7314.
39. O'Leary, M.H. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: An Enzymologist's view. *Ann Rev. Plant Physiol.* 33: 297-315
40. Perl, M. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in cotton and *sorghum* seeds and its relation to seedling development.

Planta 139: 239-243.

41. Perrot, C., Vidal, J., Bulet, A. y Gadal, P. (1981). On the cellular localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Sorghum* leaves. *Planta* 151: 226-231.
42. Perrot-Rechenmann, C., Vidal, J., Brulfert, J., Bulet, A. y Gadal, P. (1982). A comparative immunocytochemical localization study of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of higher plants. *Planta* 155: 24-30.
43. Preice, D.N. y Hedley, C.L. (1980). Developmental and varietal comparisons of pod carboxylase levels in *Pisum sativum* L. *Ann Bot.* 45: 283-294.
44. Reinert, J. (1977). Plant cell tissue and organ cultures. Ed. Springer-Verlag. New York.
45. Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. (1987). Short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 128:361-369.
46. Rodríguez-Sotres, R., López-Pozos, R. y Muñoz-Clares, R.A. (1987). Further studies of the short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 129: 191-199.
47. Rodríguez-Sotres, R. (1990). Características cinéticas y moleculares de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en relación con la regulación de su actividad *in vivo* en hoja de maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Bioquímica), Facultad de Química, UNAM.
48. Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site

- in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Arch. of Biochem. and Biophys. 276(1): 180-190.
49. Sánchez-Jiménez, E., Vargas, M., Aguilar, R. y Jiménez, E. (1988). Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. Plant Physiol. Biochem. 26(6): 723-732.
 50. Sato, F., Koizumi, N. y Yamada, Y. (1988). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase of photomixotrophically cultured green tobacco cell. Plant Cell Physiol. 29(2): 329-337.
 51. Smith, C., Doo, A. y Bown, A.W. (1979). The influence of pH on kinetic parameters of coleptile phosphoenolpyruvate carboxylase: Relationship to auxin-stimulated dark fixation. Nat. Research Council of Canadá/Conseil National du Recherches du Canadá. J. Bot. 57: 543-547.
 52. Solís, C., Sánchez-Jiménez, E., Loyola-Vargas, V.M., Cárabaez, A. y Lotina-Hennsen, B. (1989). The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C₃ and a C₄ plant. Plant Cell Physiol. 30(5): 609-616.
 53. Stiborová, M. y Leblová, S. (1983). The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. Physiol. Veg. 21(5): 935-942.
 54. Stiborová, M. y Leblová, S. (1986). Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. FEBS Lett 205(1): 32-34.
 55. Street, H.E. (1973). Culture of tissue cell plant. Ed. Blackwell Scientific Publications Oxford, Edingburgh. Melbourne.
 56. Ting, I.G. y Osmond, C.B. (1973). Photosynthetic phosphoenolpyruvate

- carboxylase: Characteristics of alloenzymes from leaves of C₃ and C₄ plants. *Plant Physiol.* 51: 439-447.
57. Ting, I.P. y Osmond, C.B. (1973). Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associate with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* 51: 448-453.
58. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* 76(9): 4350-4354.
59. Uedan, K. y Sugiyama, T. (1976). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* 57: 906-910. -910.
60. Vazquez-Tineo, M.A. (1988). Estudios comparativos de las propiedades bioquímicas e inmunológicas de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en diferentes tejidos de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica), Facultad de Química, UNAM.
61. Verdejo-Coss, J.A. (1992). Estudios sobre los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica), Facultad de Química, UNAM.
62. Vidal, J. y Cavalié, G. (1974). Mise en évidence de formes isofonctionnelles de la PEP carboxylase chez *Phaseolus vulgaris*, L.. *Physiol. Veg.* 12(2): 175-188.
63. Vidal, J. y Gadal, P. (1983). Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in *Sorghum* leaves. II. Study immunochemical. *Plant Physiol.* 57: 124-128.
64. Wedding, R.T., Rustin, P., Meyer, C.R. y Black, M.K. (1988). kinetic

studies of the form of substrate bound by phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **88**: 976-979.

65. Willmer, C.M. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. *Physiol. Veg.* **21**(5): 943-953.
66. Wu, M.X., Zha, J.J. y Shi, J.N. (1981). Studies on plant phosphoenolpyruvate carboxylase. IV. Modification of functional arginyl residues in PEP carboxylase of *Sorghum* leaves with butanedione. *Acta Phytophysiol. Sin.* **7**(1): 33-41.
67. Wu, M.X. y Wedding, R.T. (1985). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula* by interconversion of oligomeric forms. *Arch. Biochem. and Biophys.* **240**: 655-662.
68. Wu, M.X. y Wedding, R.T. (1987). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* further evidence on the dimer-tetramer interconversion. *Plant Physiol.* **84**: 1080-1083.
69. Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. y Katsuki, H. (1988). Further analysis of cDNA clones from maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄-photosynthesis. Nucleotide sequence of entire open reading frame and evidence for polyadenylation of mRNA at multiple sites *in vivo*. *FEBS Lett.* **229**(1): 107-110.