



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

AMPLIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INFERENCIAS
FILOGENÉTICAS DE LA Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa
oxigenasa (RUBISCO) Y Fosfoenol piruvato carboxilasa oxidasa
(PEP-C) DE *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd).Y
Parkinsonia praecox (Ruiz Lopez & Pavon) Hawkins

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ERIKA DÍAZ HERNÁNDEZ



IZTACALA

DIRECTOR:
Dr. ELIAS PIEDRA IBARRA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y en Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav, IPN., unidad Zacatenco.

Y forma parte del proyecto “Evaluación de la respuesta fisiológica y molecular al estrés por sequía de *Parkinsonia praecox* y *Prosopis laevigata* micorrizadas” numero IN209307 del programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de DGAPA de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Elías Piedra Ibarra por todo su apoyo para la realización de este trabajo, por su paciencia, comprensión, tiempo y buenos consejos

A mis sinodales Víctor Ramón Moreno Torres, Cesar Mateo Flores Ortiz, Rafael Emiliano Quintanar Zúñiga y Josefina Vázquez Medrano por la revisión de este trabajo y sus puntos de vista para mejorarlo

Al Dr. Alejandro Molsalvo por la secuenciación de las clonas y por la donación de algunos reactivos para la realización de los experimentos

Al laboratorio de Genética de la Unidad de Morfofisiología de la Fes Iztacala por el préstamo del digitalizador para geles

Al laboratorio de Biología Molecular de la UBIPRO de la Fes Iztacala por el préstamo del termociclador Biorad para las reacciones de PCR

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y al Dr. Roberto Ruiz Medrano por la donación de oligos de Rubisco y Catalasa

A Laura Rojas Martínez y Aarón Vélez Ramírez por los LDs.

A todos mis amigos

*A mis hermanos Irma Laura, Bonifacio, Alicia, Isabel,
Gabriel, Mario, Carolina, Benito y Lina
por todos los momentos que hemos compartido
y por la ayuda mutua para superarnos.*

A Leonor Hernández Miranda, mujer admirable

A Benito Díaz Lira, hombre de lucha que nunca se da por vencido

RESUMEN

Las plantas fijan CO_2 a través de las enzimas Rubisco y PEPC generando moléculas con 3 átomos de carbono (metabolismo C_3) o 4 (C_4 y CAM), Algunas evidencias sugieren que el metabolismo C_4 fue desarrollado como una adaptación a altas temperaturas y bajas concentraciones de CO_2 , a través de cambios en las estrategias fisiológicas y moleculares basados sobre la regulación diferencial genética temporal y tisular. Algunas evidencias experimentales indican que en varias especies de plantas las isoformas de Rubisco y PEPC son expresadas en respuestas a condiciones de estrés permitiéndoles sobrevivir exitosamente *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* a pesar de que poseen metabolismo C_3 están ampliamente distribuidas en zonas áridas y semiáridas de México, y son especialmente abundantes en Zapotitlan de las Salinas, Puebla. El objetivo de este trabajo fue conocer el rol de la Rubisco y PEPC en respuesta al estrés hídrico de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*. Oligonucleótidos fueron designados basados sobre alineamientos múltiples de secuencias de DNA de Rubisco y PEPC reportadas en el Gene Bank para amplificar estos genes por reacciones de TR-PCR. Los fragmentos amplificados fueron ligados a vectores comerciales y fueron clonados en células *E. coli* competentes. Los plásmidos recombinantes fueron sujetos a reacciones de secuenciación y las secuencias de nucleótidos fueron usadas para el análisis bioinformática. Este análisis mostró que los fragmentos amplificados no corresponden con Rubisco ni PEPC en lugar de estos un fragmento de 78 residuos mostró identidad de 84 con una LEA tipo II o Dehidrina. Alternativamente el análisis filogenético fue hecho usando secuencias de aminoácidos de la subunidad larga de Rubisco y de PEPC de varias especies de plantas. El árbol filogenético de Rubisco mostró 8 clados y una politomía de 51 secuencias no agrupadas con valores de bootstrap mayores a 50, la Rubisco es altamente conservada debido a su importancia funcional, por esta razón dificulta su análisis filogenético. De otra manera el árbol filogenético de PEPC contiene 12 clados definidos con valores de bootstrap mayores a 65, están integrados por secuencias provenientes de la misma familia por tipo fotosintético y uno integrado por secuencias ortólogas (género *Flaveria*). La estructura del árbol parece sugerir que el origen de las distintas isoformas ocurrió por duplicación de formas ancestrales y posterior divergencia; eventualmente esas formas modificadas pudieron ser favorables para la aparición independiente de tipos metabólicos C_4 o CAM. El análisis parecen sugerir que la inclusión de distintas isoformas no permiten inferir la historia evolutiva de grupos diversos, debido que esas isoformas han tenido un origen independiente, Estas isoformas

pueden ser usadas para inferir la historia evolutiva en grupos íntimamente relacionados pero actualmente no hay homólogos de este gen en muchos grupos.

ABSTRAC

The plants fix CO₂ through of the enzymes Rubisco and PEPC generating molecules whit 3 (C₃ metabolism) or alternatively with 4 carbon atoms (C₄ y CAM). Some evidences suggest that C₄ metabolism was developed as an adaptation to high temperatures and low concentrations CO₂ by change in physiological and molecular strategies based on tissular and temporal diferential genetic regulation. Some experimental evidences indicates that in several plant species the enzymes Rubisco and PEPC isoforms are expressed in response to stress conditions allowing them survive successfully. *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* although possess metabolim C₃ are largely distributed in arid and semiarid zones in Mexico and are especially abundant in Zapotitlan of Salinas, Puebla. The aim of this work was know the role of the Rubisco and PEPC in the water stress response of *P. laevigata* and *P. praecox*. Oligonucleotides were designed based on multiple alignments of PEPC and Rubisco DNA sequences reported in the Gene Bank to amplify these genes by RT-PCR reactions. The amplified fragments were bound to commercial vectors and cloned in *E. coli* chemically competent. The recombinant plasmids were subjected to sequencing reactions and the nucleotide sequences were used to bioinformatics analysis. This analysis shown that the amplified fragments do not correspond with Rubisco neither PEPC, instead it a fragment of 78 residues showed identity 84 with a LEA II or Dehydrin. Alternatively, the phylogenetic analysis was did using aminoacid sequences of large subunit of Rubisco and of PEPC of several plant species. The phylogenetic tree of Rubisco show 8 clades and a politomy of 51 sequences no grouped whit boostrap values greater than 50. The Rubisco is high conservated due to its functional importance, perhaps this reason provoque the difficulties in the phylogenetic analysis. On the other hand, the phylogenetic tree of PEPC contain 12 defined clades with boostrap values greater than 65, they are integrated by sequences belonging to the same family (*Poaceae*, *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*) by photosynthetic type and one integrated by orthologous sequences (genus *Flaveria*). The structure of the tree seem to suggest that the origin of the distinct isoforms occurred by means of duplication of ancestral genes and later divergence, eventuality this forms modified could be favourable for the independent apparition of types metabolic C₄ or CAM. The analyses seem suggest that the inclusion of multiples isoforms do not allow infer the evolutionary history of diverse groups, because these isoforms have had an independent origin. These isoformas could be used to infer the phylogenetic hystory in intimately related groups, but actually homologues of this gene are not in many groups.

I. INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el mecanismo más importante de entrada de energía a la biosfera, el proceso se puede dividir en fase luminosa y fase oscura, la luminosa se lleva a cabo en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, es la encargada de convertir la energía lumínica en energía química y utiliza NAD y ADP para la liberación de O₂; la fase oscura ocurre en el estroma de los cloroplastos, y en ella se da la fijación de carbono inorgánico (CO₂) para convertirlo en moléculas orgánicas (Salisbury y Ross, 1992).

1.1 Mecanismos para la fijación de CO₂

Con base en los mecanismos de asimilación de CO₂, las plantas terrestres pueden poseer un tipo fotosintético C₃, C₄ o el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). En plantas C₃ la reducción del CO₂ consta de tres fases principales: la carboxilación que implica la incorporación del CO₂ y H₂O a una molécula de 5 átomos de carbono (la RuBP) para formar dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA); la reducción, donde el grupo carboxilo del 3-PGA se reduce a un grupo aldehído del 3-fosfogliceraldehído (3-PGaldehído) que puede ser utilizado para la síntesis de carbohidratos (sacarosa o almidón) o bien para la regeneración, donde se utiliza un ATP, para transformar 5-fosfato de ribulosa en RuBP necesaria para reaccionar con el CO₂ adicional reiniciándose el ciclo (Salisbury y Ross, 1992). Las plantas C₄ asimilan CO₂ involucrando al menos las células del mesófilo y las del haz de la vaina, el proceso consiste en la asimilación del CO₂ en un ácido de 4 carbonos (málico o aspártico) en las células del mesófilo desde donde es transferido a las células del haz de la vaina para ser descarboxilado mediante la participación de varias enzimas carboxilasas y así formar una molécula de 3 carbonos y CO₂, el cual es incorporado al ciclo de Calvin mediante su unión con la Rubisco, por su parte, la molécula de 3 carbonos es transferida a las células del mesófilo para reiniciar el ciclo. Las plantas con el metabolismo CAM usualmente viven en condiciones extremas donde evitan la pérdida de agua abriendo sus estomas por la noche y permitiendo la entrada de CO₂, el cual es fijado como oxalacetato por la fosfoenol piruvato carboxilasa y posteriormente como ácido málico mediante la enzima NADP malato deshidrogenasa y almacenado en las vacuolas. En el día, cuando los estomas se cierran, el ácido málico es recuperado de las vacuolas y descarboxilado, de esta manera, los niveles intracelulares de CO₂ se incrementan paulatinamente, los estomas al estar cerrados evitan que escape siendo fijado e incorporado al ciclo C₃ por la Rubisco. De esta manera, las plantas con metabolismo CAM realizan la fijación de CO₂ en un proceso separado espacial y temporalmente (Taiz y Zeiger, 1998).

Se ha considerado al metabolismo C_4 como altamente eficiente dado que concentra al CO_2 en las células del haz de la vaina suprimiendo la oxigenación y evitando la fotorespiración. En contraste, el metabolismo C_3 ha sido considerado como un proceso despilfarrador dado que las plantas con ese metabolismo poseen bajas tasas de actividad fotosintética, altos puntos de compensación de CO_2 y limitación por fotorespiración (Ku *et al.*, 1996). Sin embargo y a pesar del despilfarro energético, las plantas C_3 representan más del 90% de las plantas superiores, probablemente debido a que sus estrategias metabólicas les permiten competir exitosamente en climas templados con humedad relativa elevada. Aún cuando las plantas C_4 se encuentran en menor proporción, se ha estimado que tienen la capacidad de producir mayor biomasa que las C_3 debido a que su manera de asimilar CO_2 redundante en altas tasas de fotosíntesis neta, bajos puntos de compensación del CO_2 y bajas tasas de fotorespiración (Hess, 1980). Las plantas C_4 , como se dijo antes, prosperan en climas extremos con iluminación intensa, altas temperaturas y baja humedad relativa. Por su parte, las plantas CAM son propias de climas desérticos y subdesérticos dado que poseen estrategias adaptativas que les permiten ocupar y competir en ambientes estresantes con intensa iluminación, salinidad elevada, altas temperaturas y pronunciados déficits hídricos (Cushman y Bohnert, 1999). Este grupo de plantas presenta una amplia variabilidad: En sus estrategias metabólicas o fisiológicas se han reportado plantas CAM obligadas o constitutivas y otras que presentan fluctuaciones en el contenido de ácidos C_4 pero con nula asimilación nocturna de CO_2 que se han designado como cercanas a C_3 o C_3 facultativas. Entre los tipos obligados y los facultativos se han encontrado una gran cantidad de formas intermedias, inclusive, se han encontrado especies en las cuales la captación de CO_2 y la acumulación de ácidos solamente se realiza en las partes de la planta que están expuestas a concentraciones limitadas de CO_2 (Cushman y Bohnert, 1999). La plasticidad del metabolismo CAM ha sido ejemplificada con especies inducibles o facultativas como *Mesembryantum crystallinum*, *Vanilla planifolia*, *Aloe arborescens* entre otras, que usan el metabolismo C_3 para maximizar su desarrollo cuando hay suficiente disponibilidad de agua y que retornan a CAM para mantener su integridad fotosintética en los periodos cuando el suplemento de agua se restringe (Cushman y Borland, 2002).

Las plantas C_3 , C_4 y CAM presentan diferencias anatómicas que permiten determinar el tipo metabólico con cierto grado de confiabilidad. Las plantas con metabolismo C_4 presentan las células del mesófilo arregladas en capas en torno a las células del haz de la vaina (anatomía kranz), mientras que el arreglo tisular en las plantas CAM más bien recuerda a la distribución

celular de las C_3 en donde las células del mesófilo presentan el arreglo en empalizada sin distribuirse en torno a las células del haz de la vaina (Gerald *et al.*, 2004).

1.2 Algunas inferencias evolutivas de los mecanismos fotosintéticos

Dado que las enzimas participantes en el metabolismo C_4 también se encuentran en las plantas C_3 , aunque involucradas en procesos distintos y con propiedades diferentes, se ha sugerido que la aparición del metabolismo C_4 se dio mediante cambios en la anatomía de la hoja, en los patrones de expresión genética y en las propiedades cinéticas de algunas enzimas clave (como la PEPC y Rubisco). Así durante el curso de la evolución ocurrieron modificaciones en los mecanismos de regulación genética que permitieron la expresión célula y órgano específica, logrando la actividad enzimática que tiene lugar en los tipos celulares de la anatomía Kranz mediante la modificación de factores regulatorios *cis* así como factores de acción *trans*. Algunos estudios evolutivos atribuyen el desarrollo del complejo metabólico C_4 a presiones selectivas impuestas por el suministro reducido de CO_2 , altas temperaturas, limitación en la disponibilidad de agua así como alta luminosidad, las cuales pudieron favorecer la evolución de los mecanismos de concentración de CO_2 en distintos linajes de plantas terrestres (Ku *et al.*, 1996; Gerald, 2004).

La distribución taxonómica de las plantas CAM actuales (en 33 familias y en más de 328 géneros incluyendo mono y dicotiledóneas), así como el análisis de las secuencias de varias proteínas (entre ellas la PEPC) han permitido proponer que el metabolismo CAM tiene un origen polifilético y confirman que tanto C_4 como CAM surgieron de plantas con el metabolismo C_3 , inclusive análisis moleculares parecen apuntar que el surgimiento de CAM precedió a C_4 (Cushman y Bohnert, 1999) y que las modificaciones genéticas para lograr los mecanismos de concentración de CO_2 en las plantas CAM son pocas comparadas con las modificaciones requeridas para lograr el metabolismo C_4 (Ku *et al.*, 1996).

1.3 La fosfoenol piruvato Carboxilasa y la Ribulosa 1,5 fosfato carboxilasa oxigenasa han sido utilizadas en inferencias evolutivas del metabolismo fotosintético.

1.3.1 Características de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa Oxigenasa

La holoenzima posee una masa molecular de 560 kDA, está constituida por subunidades largas (rbcL) y cortas (rbcS), las primeras están codificadas por el gen *rbcL* del cloroplasto de plantas terrestres y algas verdes, tienen una masa molecular de 55 kDA y poseen el sitio catalítico de la

enzima. Por su parte, una familia de genes nucleares codifica las subunidades cortas que poseen una masa molecular de 15 kDA, las cuales se adicionan a las largas formando al menos dos tipos de complejos: la forma I presente en plantas superiores, algas y protobacterias autótrofas, está compuesta de 8 subunidades largas y 8 pequeñas y la forma II, constituida por un dímero de subunidades largas, se presenta en algunos procariontes y dinoflagelados. Adicionalmente, se han reportado variantes entre las cuales encontramos la de algunas algas que está constituida por 8 unidades L y S codificadas por el genoma del cloroplasto, así como la Rubisco reportada en Archeobacterias (Spreitzer, 2002) constituida solamente por 5 dímeros de unidades L (Forma III) (Ashida *et al.*, 2003). Algunos autores designan a las formas III y IV como proteínas “semejantes a Rubisco” dado que, al parecer, estas enzimas no participan directamente en el ciclo de Calvin. Específicamente el grupo IV carece de varios residuos que son requeridos para la actividad catalítica de la Rubisco y parecen estar involucradas en la recuperación de metionina, mientras que la forma III no ha sido relacionada con funciones metabólicas específicas (Ashida *et al.*, 2003).

Análisis bioquímicos y moleculares han determinado que el sitio activo de la Rubisco se forma mediante la interacción de dos subunidades largas. La interacción entre esas subunidades se da entre los residuos del loop que conecta el extremo Carboxilo de las β plegadas y el extremo amino de la α hélice en el barril α/β de una subunidad con el dominio del extremo amino de la otra subunidad formado por 4 laminas β antiparalelas (Hudson *et al.*, 1989). 4 subunidades pequeñas se unen a cada uno de los extremos de 4 pares de subunidades largas asociadas, cada una de las subunidades pequeñas interactúa con 3 subunidades largas. El origen y el papel de las subunidades pequeñas forma I permanecen desconocidas dado que las enzimas forma II (que carecen de subunidades pequeñas) contienen todos los elementos estructurales para la catálisis (Spreitzer, 2002). Se han analizado secuencias del gen *rbcL* de plantas C₃ y C₄ evolutivamente cercanas encontrando de 3 a 6 sustituciones aminoácidos, en las que la sustitución Met por Ile (C₃ y C₄ respectivamente) es consistentemente observada. Interesantemente el residuo 309 forma parte del barril α/β . Mientras que las regiones promotoras y de inicio de la transcripción están altamente conservadas entre especies C₃ y C₄ (Hudson *et al.*, 1989).

1.3.2 Características de la Fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC)

Esta enzima encuentra ampliamente distribuida en plantas superiores, también se encuentra en bacterias, cianobacterias y algas verdes. En plantas se han encontrado isoformas tanto en tejido fotosintético como no fotosintéticos: su función en el proceso fotosintético parece ser ayudar a reemplazar los ácidos del ciclo de Krebs que se utilizan en reacciones sintéticas y ayudar a formar el malato necesario en los procesos de balanceo de carga (Salisbury y Ross, 1982); simultáneamente, se le ha involucrado en procesos como la formación y germinación de la semilla, maduración del fruto, además que al parecer tiene un rol especializado en las células guarda durante la apertura estomática. Los genes que codifican las isoformas de PEPC se han agrupado en pequeñas familias, por ejemplo, en plantas de sorgo se han caracterizado al menos tres genes nucleares (SvC3, SvC3rl y SvC4) que codifican una forma relacionada con el metabolismo C_3 , otra que se expresa específicamente en raíz y una isoforma más involucrada en el metabolismo C_4 ; la familia de genes que codifican PEPC en maíz está integrado al menos por 5 genes que han sido clasificados en tres grupos con base en sus patrones de expresión, el gen PEPc4, el involucrado en el metabolismo C_4 , está localizado cerca del centrómero del cromosoma 9, mientras que otros genes de esta familia se localizan en los cromosomas 4L, 5 y 7 (Chollet *et al.*, 1996). Plantas dicotiledóneas del género *Flaveria* con metabolismo C_3 y C_4 contienen familias de isogenes PEPC en subgrupos; la isoforma C_4 en la especie *F. trinervia* es codificada por el subgrupo PpcA, curiosamente, se han reportado genes homólogos a PpcA en *Flaveria pringlei* (con metabolismo C_3), aunque los homólogos a PpcA tienen niveles de expresión bajos comparados con los niveles en las especies C_4 . Adicionalmente, en *Mesembryanthemum crystallinum* (planta CAM facultativa) se han caracterizado dos (Ppc1 y Ppc2) de los tres posibles isogenes, Ppc1 presenta actividad transcripcional alta y selectiva cuando la planta se encuentra en estrés y pasando del metabolismo C_3 a CAM (Chollet *et al.*, 1996). Finalmente, *Hydrilla verticillata* es una planta que típicamente presenta metabolismo C_3 , sin embargo cuando se expone a condiciones de baja concentración de CO_2 cambia a un sistema C_4 , que coexiste con el ciclo de Calvin. Una isoforma de PEPC funciona específica y exclusivamente durante el proceso de inducción de un sistema metabólico (Rao *et al.*, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

La presencia de *Prosopis* en ambientes áridos y semiáridos ha sido atribuida a características fenológicas como la reducción de superficie foliar, la presencia de pubescencia, presencia de estomas hundidos y distribuidos en la superficie adaxial de las hoja con lo que quedan protegidos de las condiciones de estrés (Palacios *et al.*, 2000). Además las semillas tienen alta viabilidad para germinar en distintas condiciones de suelo (Golubov *et al.*, 2001). La distribución de *Prosopis* y *Parkinsonia* en estas condiciones también ha sido asociada a su sistema radicular de rápido crecimiento que puede alcanzar grandes profundidades llegando a los mantos freáticos. Sin embargo no se ha analizado la respuesta molecular en condiciones ambientales estresantes en la cual se podrían involucrar, entre otros genes, a los que codifican enzimas involucradas en el proceso fotosintético como la Rubisco y la PEPC. Para realizar un análisis de la regulación de la expresión es necesario contar con fragmentos caracterizados de esos genes que pudieran servirnos como sondas para analizar si estos son expresados diferencialmente cuando *Parkinsonia* y *Prosopis* son sometidas a condiciones de estrés hídrico. Por lo anterior en este trabajo el objetivo fue obtener, amplificar y caracterizar fragmentos de esos genes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Prosopis laevigata y *Parkinsonia praecox*: plantas con metabolismo C3 ampliamente distribuidas en zonas con condiciones extremas

Prosopis laevigata también llamado "mezquite" es una planta que pertenece a la vegetación de Matorral xerófilo (Rzedowski, 1988) y que a pesar de poseer un tipo fotosintético C3, está ampliamente distribuida en el territorio nacional (Aguascalientes, Coahuila, Chiapas, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla), siendo especialmente abundante en el Valle de Zapotitlan, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz (Arias, 2000) y en la vegetación halófila de San Luis Potosí y Zacatecas. Es una planta leguminosa de la familia *Mimosaceae* que alcanza de 2 a 3 m de altura (cuando arbusto) y de 5 a 6 mts. (cuando árbol), sus ramas poseen espinas estipulares de 4 cm de largo aproximadamente, las hojas son pecioladas, con pinas que contienen alrededor de 20 pares de folíolos, las flores son de color blanco y amarillo (Calderón y Rzedowski, 2001). La floración se da entre marzo y mayo. Es una planta muy importante dados sus usos tradicionales; la madera es ampliamente usada como leña o carbón debido a que su combustión es lenta y genera gran cantidad de calor. La madera también es usada para fabricar muebles, artesanías, construcciones rústicas (Paredes, 2001), la corteza produce goma utilizada en la industria alimenticia. Sus frutos son consumidos por el ser humano en formas diferentes que incluyen fruta fresca, hervidos, en harina para preparar pinole, galletas, pan, pastel y atole. Asimismo pueden ser empleados como forraje para el ganado en época de secas (Maldonado Aguirre y de la Garza, 2000), ecológicamente es importante ya que modifica el microambiente, evitando la pérdida de agua e incrementa la cantidad de materia orgánica del suelo, favoreciendo la germinación de las semillas y el crecimiento de plantas (Olalde-Portugal y Vernon-Carte, 2000) como la pitahaya (*Hylocereus undantus*) que crece al pie de su tallo (Arias, 2000).

Se han evaluado algunos aspectos demográficos de *Prosopis laevigata* en Zapotitlan de las Salinas, Tehuacan: en una terraza conservada y en otra deteriorada se encontró que los individuos que crecen en la deteriorada presentan mayor densidad y producen mayor número de frutos, mientras que la estructura de tamaños, la germinación y la sobrevivencia de las plántulas fue similar en ambas terrazas. Debido a lo anterior se ha considerado la posibilidad que el deterioro no afecta negativamente sus poblaciones, probablemente debido a las características morfológicas, anatómicas y fisiológicas que les permiten adaptarse y sobrevivir exitosamente (Roldán, 2004), sin embargo no se han evaluado sus características a nivel molecular. Por lo que

queda la posibilidad de que su distribución y éxito en ambientes alterados esté relacionado con características de algunas enzimas involucradas en el proceso fotosintético.

Tal como el mezquite, *Parkinsonia praecox* ("palo verde" o "manteco"), también posee tipo fotosintético C₃; se distribuye en los terrenos aluviales cercanos al río Tepalcatepec Michoacán, en zonas limítrofes de Jalisco, en la Cuenca Alta del Papaloapan y en Cuicatlán, Oaxaca (Rzedowski, 1988), también se encuentra abundantemente en Zapotitlan de las Salinas, Puebla. Esta es una leguminosa de la familia *Caesalpinaceae* que alcanza entre 10 a 12 m de altura, sus hojas son bipinadas, las flores son amarillas con pedicelos y las semillas son oblongas de color grisáceo. Algunos ecólogos dicen que el tallo verde realiza la fotosíntesis cuando no hay hojas en la época de sequía, el periodo de floración ocurre entre febrero y marzo. Esta especie se usa como leña y como nodriza para la pitahaya además, es económicamente importante dado que durante el mes de mayo, una especie de mariposa deposita huevecillos, los cuales en junio y julio, cuando se encuentra en etapa de pupa ("cuchama"), es colectada por la gente y hervida con sal para ser consumidas, el platillo es apetecido dado que se le atribuyen propiedades afrodisíacas en la cultura popular de la región (Arias, 2000).

El "palo verde" es importante en la modificación del ambiente extremoso permitiendo que prosperen especies anuales y herbáceas. Forma islas de fertilidad al crear condiciones ambientales benéficas para otros componentes del ecosistema por lo que se le considera como una especie clave para la reforestación y rehabilitación de suelos degradados. Por lo tanto, se le ha considerado junto con algunas especies de la familia de las leguminosas como plantas potencialmente rehabilitadoras y abundantes en el Valle de Tehuacan (Dávila *et al.*, 1993 citado en Labrada, 2005).

Parkinsonia praecox es el forofito más importante para *Tillandsia recurvata* debido a que la fase de dispersión y fijación de sus semillas coincide con el periodo en el que *P. praecox* florece y carece o inicia el desarrollo de nuevas hojas y brotes, por lo que las semillas de la epífita llegan y se establecen sin dificultad (Informe UBIPRO).

Se han evaluado parámetros fotosintéticos de especies C₃ y C₄ en las terrazas aluviales con distinto grado de perturbación en el Valle de Zapotitlan, Tehuacan encontrando mas especies que poseen metabolismo C₃ y pocas especies con metabolismo C₄, la distribución de estos tipos fotosintéticos parece relacionarse con el gradiente de deterioro probablemente debido a que las especies C₄ son más eficientes en el uso de recursos y más tolerantes al estrés. Sin embargo,

cuando se evaluaron algunos parámetros fotosintéticos como tasa de fijación de CO₂, conductancia estomática al agua y humedad relativa de tres especies C₃ (*Prosopis laevigata*, *Celtis pallida* y *Viguiera dentata*) y dos especies C₄ (*Gomphrena decumbens* y *Setaria poiretiana*) en la zona conservada y la deteriorada, los resultados indicaron que las especies con tipo fotosintético C₄ sólo se encuentran en la época de lluvias, y registraron tasas fotosintéticas bajas (5 μmoles CO₂ m⁻² seg⁻¹). En contraste, se registró que las especies C₃ se mantienen a lo largo del año y muestran tasas de fijación de CO₂ mayores (30 μmoles CO₂ m⁻² seg⁻¹), siendo *Prosopis laevigata* y *Viguiera dentata* las especies para las que se registraron las mayores tasas fotosintéticas (Flores *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Gehrig *et al.*, en 1998 realizaron un análisis comparativo de isoformas de PEP-Carboxilasa en *Vanilla planifolia* Salib. (*Orchidaceae*), una planta CAM obligada en la que los cloroplastos de las raíces aéreas presentan metabolismo C_3 , mientras que las hojas y tallos exhiben metabolismo CAM. El alineamiento de las secuencias de los cDNA evidenció un alto grado de homología entre las distintas isoformas de PEPC. Mientras que el análisis de expresión diferencial mostraron que una isoforma relacionada con CAM se expresa principalmente en las hojas y tallos.

Honda *et al.*, en 1986 obtuvieron un cDNA de PEPCarboxilasa de *Aloe arborescens* y analizaron por Northern Blot la presencia del transcrito de las PEPC. Los resultados indicaron que esta isoforma es específicamente expresada en hojas verdes y sugirieron fotosíntesis de tipo CAM. El cDNA codifica 964 aminoácidos con alto grado de conservación con otras PEP-Carboxilasas. El análisis filogenético con PEP-Carboxilasas, adicionales permitió establecer que la enzima del tipo CAM se ubica filogenéticamente entre PEP-Carboxilasa C_4 y PEP-Carboxilasa típicas.

Rickers *et al.*, en 1989 obtuvieron la secuencia de un cDNA que codifica la PEPC en la planta del hielo *Mesembryanthemum crystallinum* y detectaron un incremento dramático en la expresión del gen al colocar la planta en condiciones de estrés salino. El incremento de la expresión de PEPC coincidió con el cambio de fotosíntesis C_3 a CAM. La secuencia de aminoácidos mostró identidad de 74.9%, con una secuencia de cuatro aminoácidos conservada que al parecer tiene un papel importante en la función de la enzima. Schmitt y Piepenbrock en 1992 indujeron la síntesis del mRNA de PEP-Carboxilasa de *Mesembryanthemum crystallinum* exponiéndola a estrés hídrico y midieron la abundancia de PEP-Carboxilasa en hojas, en ella la síntesis del mRNA empezó a las 10 semanas de edad posterior al tratamiento en un ambiente controlado, comportándose como una CAM facultativa.

Lara *et al.*, en 2004 sometieron a *Portulaca oleracea* (una planta C_4) a estrés y observaron que se induce un metabolismo parecido a CAM en el que observan diferencias en la concentración de varias enzimas relacionadas con la asimilación de CO_2 como PEP-carboxilasa y NAD-ME.

Sánchez y Cejudo en 2003 encontraron un elevado grado de conservación funcional y

estructural en la PEP-Carboxilasa de plantas y bacterias. Reportaron que la enzima bacteriana carece del dominio de fosforilación del extremo N terminal encontrado en plantas. Sin embargo, describieron un gen de *Arabidopsis* y plantas de arroz que codifica una PEP-Carboxilasa con más similitud con la enzima PEP-C de *Escherichia coli* que con la de plantas, las cuales carecen del dominio de fosforilación.

III. HIPÓTESIS

Prosopis laevigata y *Parkinsonia praecox*, a pesar de presentar metabolismo fotosintético C3 están ampliamente distribuidas en regiones semiáridas, esta capacidad se debe en parte a propiedades moleculares que les permiten fijar CO₂ atmosférico en condiciones ambientales extremas. Sus estrategias adaptativas pueden involucrar variaciones en la secuencia de la Rubisco y PEPC o bien alteraciones en los patrones de expresión genética.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

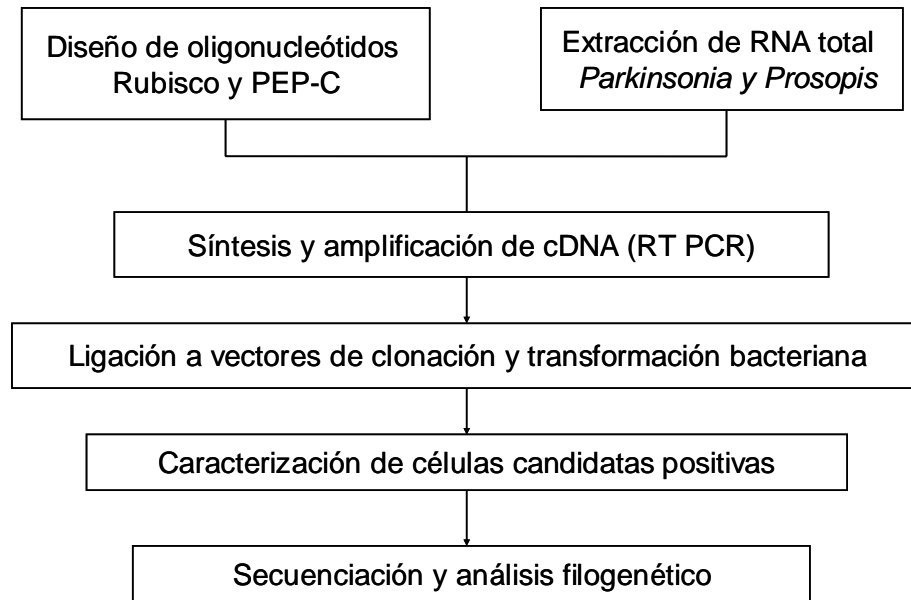
Amplificar y caracterizar fragmentos de Rubisco y PEPC de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia Praecox*, realizar un análisis filogenético e inferir si estas moléculas participan en la distribución de las especies en ambientes extremos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

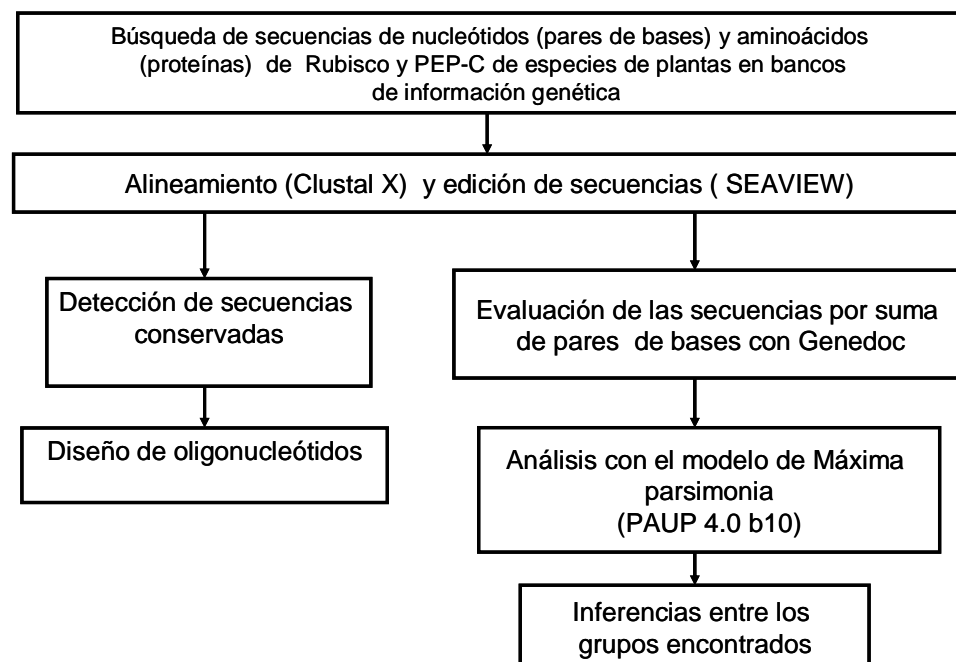
- 1 Diseñar iniciadores parcialmente degenerados para amplificar Rubisco y PEPC con base en alineamientos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos depositados en los bancos de información genética.
- 2 Amplificar, clonar y secuenciar fragmentos de genes que codifican Rubisco y PEPC en *P. levigatae* y *P. praecox*.
- 3 Establecer las inferencias filogenéticas de algunas especies vegetales con base en las secuencias de Rubisco y PEPC.
- 4 Determinar las Inferencias filogenéticas de *P. lavigatae* y *P. praecox* con base en la secuencia de Rubisco y PEPC.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

AMPLIFICACIÓN CARACTERIZACIÓN



DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS Y ANALISIS FILOGENÉTICO



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracción de RNA total

Se utilizó el protocolo de Logemann 1987, con algunas modificaciones. Se pesó 1 gramo de tejido vegetal y se maceró en mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Antes de que se descongelara, se agregó de 1 a 2 ml de buffer de extracción (Cloruro de guanidinio 8M, MOPS 50 mM), una vez homogeneizado se transfirió a dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se adicionó 0.9 ml de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), posteriormente se agitó vigorosamente en vórtex. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 45 minutos, al cabo, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo a la cual se agregó nuevamente fenol: cloroformo: isoamílico pero esta vez se centrifugó solamente durante 20 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se le adicionó 1 volumen (0.7 ml aproximadamente) de etanol absoluto y 1/3 del volumen de ácido acético 1 M (0.2 ml aproximadamente). La mezcla fue almacenada a -20 °C al menos durante 2 horas, posteriormente se descongeló en hielo y se sometió a centrifugación a 13000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue desechado y la pastilla fue resuspendida en 1 ml de acetato de sodio 3 M pH 5.2, fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente y la pastilla fue lavada dos veces con 400 microlitros de etanol al 70%. Finalmente se eliminó el exceso de etanol y la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua bidestilada desionizada estéril.

6.2 Verificación de la calidad y cantidad de RNA total

Las muestras fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (agarosa 1.5 % y 2.2 M de formaldehído) para lo que se mezcló 3 µl de la muestra con 6 µl del buffer desnaturalizante (formaldehído: MOPS 10X: formamida 1:2:4) y se incubó a 65°C durante 15 minutos, al cabo, la muestra fue transferida rápidamente al hielo, finalmente fue mezclada con 2 µl de buffer de carga (Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.25% y Xylen cianol FF 0.25%), las muestras fueron cargadas al gel y corridas a 75 Voltios durante 1 hora aproximadamente a temperatura ambiente (Sambrook, 2001).

Previamente la cámara, peines y moldes para el gel fueron sumergidos en benzal al 10% durante 30 minutos y enjuagados con abundante agua bidestilada tratada con DEPC.

6.3 Preparación de células competentes con CaCl₂

Una colonia aislada de *E. coli* DH 5 α fue transferida a un tubo de ensaye con 10 ml de Terrific Broth (peptona, extracto de levadura, glicerol y buffer de fosfatos: KH₂ PO₄ 0.17 M, K₂ HPO₄ 0.72M), el cual fue incubado a 37°C en agitación constante durante 12 horas. De esa suspensión bacteriana se tomó 1 ml aproximadamente y fue transferido a un matraz con 100 ml de TB, la mezcla fue incubada a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.3. El cultivo fue transferido a tubos de 50 ml estériles los cuales fueron sometidos a centrifugación (5000 rpm, 4°C durante 10 minutos), la pastilla fue resuspendida en 30 ml de CaCl₂ 100 mM y mantenida en hielo durante 45 minutos, al cabo fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, fue desechado el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 2 ml de CaCl₂ 100 mM. Finalmente la suspensión celular fue distribuida en alícuotas de 200 μ l en tubos eppendor de 1.5 ml y almacenadas a -70°C hasta su uso (modificado de Sambrook, 2001)

6.4 Preparación de células competentes con Rbcl

Una colonia aislada de *E. coli* DH 5 α fue transferida a un tubo de ensaye con 10 ml de Terrific Broth (TB), el cual fue incubado a 37°C en agitación constante durante 12 horas. De esa suspensión bacteriana se tomó 1 ml aproximadamente y fue transferido a un matraz con 100 ml de TB, la mezcla fue incubada a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.3. El cultivo fue transferido a tubos de 50 ml estériles los cuales fueron sometidos a centrifugación (5000 rpm, 4°C durante 10 minutos), la pastilla fue resuspendida en 16 ml de TFB I (KO AC 30 mM, Rb Cl 100 mM, Ca Cl 10 mM, Mn Cl₂ 50mM) y mantenida en hielo durante 45 minutos, al cabo fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, fue desechado el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 2 ml de TFB II (MOPs 10mM, Ca Cl₂ 75 mM, Rb Cl 10 mM, glycerol 15%) y mantenida en hielo por 15 min. Finalmente la suspensión celular fue distribuida en alícuotas de 200 μ l en tubos eppendor de 1.5 ml y almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.5 Transformación de *E. coli* competentes

Se descongeló la alícuota de *E. coli* competentes, se le agregó 100 nanogramos de DNA de plásmido y se incubó a 42°C durante 90 segundos. Posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos, se le agregó 800 μ l de TB y se incubó a 37°C durante 1 hora, al cabo, se centrifugó a

13000 rpm durante 1 minuto, del total del sobrenadante obtenido, se desecharon $\frac{3}{4}$ partes y la pastilla fue resuspendida en $\frac{1}{4}$ de sobrenadante restante.

6.6 Verificación de la eficiencia de transformación

Las células competentes fueron transformadas con 100 ng de DNA plasmídico, se utilizó como control puC Invitrogen, las bacterias fueron espatuladas en cajas petri con agar LB, ampicilina (50µl), IPTG (7 µl) y XGAL (35 µl) y se incubaron a 37°C durante 12 horas, al cabo se contaron las colonias, el número fue sustituido en la siguiente formula:

$$\frac{\# \text{ colonias}}{10 \text{ pg transformadas}} \times \frac{106 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{300\mu\text{l} \text{ celulas transformadas}}{\mu\text{l} \text{ espatulados}} = \frac{\# \text{ transformantes}}{\mu\text{g} \text{ plásmido DNA}}$$

Obteniendo que la eficiencia de transformación es de 8×10^5 ufc el cual resulta un valor adecuado para su uso.

6.7 Extracción de DNA plasmídico (Minipreparación)

De 1 a 2 colonias transformadas fueron transferidas a tubos con 3 ml de TB, se incubaron a 37°C en agitación constante por 12 horas, la suspensión bacteriana fue transferida a tubos ependor de 1.5 ml. y centrifugada a 3000 rpm durante 2 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante (la operación fue repetida hasta agotar la suspensión bacteriana del tubo). Al cabo, a la pastilla se le agregó 100 µl de la solución I (Tris-Hcl 25 mM y EDTA 10mM), se agitó vigorosamente en vórtex y se le agregó 200 µl de la solución II (Hidróxido de sodio 0.2 N y SDS 1%), se incubó en hielo por 10 minutos con agitación suave, posteriormente se le agregó 150µl de la solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial y H₂O), se agitó y se incubó por 15 minutos en hielo. Después se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 2 volúmenes de fenol: cloroformo (1:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló en vórtex y se incubó durante $\frac{1}{2}$ hora a – 20°C. Al cabo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue lavada 2 veces con etanol al 70%. Se eliminó el exceso de etanol y posteriormente la pastilla fue resuspendida en 50µl de agua bidestilada desionizada estéril y

almacenada a -20°C hasta su uso (Sambrook, 2001)

6.8 Verificación de la integridad del DNA plasmídico

Las muestras de DNA fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para lo que se mezcló 3 µl de la muestra con 2 µl del buffer de carga (Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.25% y Xylen cianol FF 0.25%). Las muestras fueron cargadas y corridas a 75 voltios durante 1 hora aproximadamente a temperatura ambiente (Sambrook, 2001).

6.9 Amplificación y secuenciación

Para la obtención del cDNA se utilizó la enzima Transcriptasa reversa para la síntesis de la primera cadena. Se utilizó 2µl de RNA total, 1µl del oligo directo y 1µl del oligo reverso, se incubaron a 65°C por 10 minutos y se transfirieron rápidamente a hielo por 2 minutos, a la mezcla se le agregó 2 µl de buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, KCL 375 mM, MgCl₂ 15 mM) 5X de primera cadena, 1µl de DTT 0.1 M, 1µl de dNTP's y 0.5µl de la enzima reverso transcriptasa, se homogenizó la muestra cuidadosamente y se incubó a 42°C durante 1 ½ horas. Al cabo se colocó por 15 minutos a -60°C para inactivar la reacción.

Para la amplificación del cDNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó 1µl del producto de la reacción de reverso transcripción y se adicionó 2.5µl de Buffer PCR 10X (200mM Tris-HCl pH. 8.4 y 500mM KCl, 1.5 µl de Mg Cl₂ 50 mM), 1.5µl de dNTP Mix 10mM, 1 µl de iniciador directo, 1µl iniciador del reverso, 1µl de Taq DNA polimerasa. La reacción se realizó en un termociclador Biorad con un programa en el que se incluyó 1 ciclo de desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos de amplificación, la temperatura de alineamiento óptima fue determinada experimentalmente mediante la utilización de un gradiente de temperatura. El producto de la amplificación fue observado mediante un transiluminador de luz UV y en su caso fotografiado con un analizador de gel (Kodak Logic Analyzer 100).

6.10 Diseño de oligonucleótidos y análisis filogenético

Se realizó una búsqueda heurística con el programa Blastn en el Gene Bank (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de secuencias de aminoácidos de las enzimas involucradas en la fotosíntesis PEPC y RUBISCO de diferentes especies de plantas, se eligieron las secuencias que presentaron un valor de expectación (E) menor 0.01. Las secuencias recuperadas del banco de genes fueron alineadas con el programa Clustal X

(Thompson, 1997), los alineamientos fueron editados con el programa SEAVIEW (Galtier, 1996) y evaluados mediante el modelo de suma de pares con el programa Genedoc (Nicholas y Nicholas, 1997). Los alineamientos múltiples se utilizaron para diseñar oligonucleótidos degenerados con base en secuencias conservadas y fueron base para el Análisis filogenético, el cual se realizó con el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) con el modelo de máxima parsimonia para lo cual se realizó una búsqueda heurística conservando los 100 mejores árboles por replica. Se buscaron los árboles con menor distancia evolutiva basados en el índice de consistencia y se realizó una prueba de robustez bootstrap con 1000 iteraciones, el árbol consenso se obtuvo mediante la regla de la mayoría en el cual las ramas con apoyo menor al 50% fueron colapsadas.

6.11 Análisis de las firmas de Rubisco y PEPC

Se utilizó el programa [PROSITE](#) del [Swiss Institute of Bioinformatics](#) (SIB) para obtener las firmas (secuencias conservadas que poseen residuos involucrados en la función y estructura de las proteínas) de cada secuencia aquí analizada. Se encontró una firma en Rubisco y 2 en PEPC, para esta última se realizaron alineamientos de acuerdo a los clados obtenidos, por familia y entre secuencias ortólogas y parálogas para analizar el grado de divergencia entre estas secuencias.

6.12 Distancia genética

Las distancias evolutivas nos permiten evaluar la divergencia de una secuencia dentro o entre un grupo de secuencias y estimar el tiempo de divergencia de las especies. Se utilizó el programa MEGA para calcular las distancias evolutivas (número de sustituciones por sitio) entre las secuencias basándose en el número de diferencias observadas. Para lo cual se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias, se formaron grupos y se calcularon distancias intra e inter por clado, por familia y por isoformas.

VII. RESULTADOS

7.1 Diseño de oligonucleotidos

Se realizó una búsqueda heurística con el programa Blastn en el Gene Bank (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de secuencias de aminoácidos de las enzimas involucradas en la fotosíntesis PEP-C y RUBISCO de diferentes especies de plantas, las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X (Thompson, 1997) y editadas con el programa SEAVIEW (Galtier, 1996), se buscaron regiones conservadas de aproximadamente 25 pb a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos (cuadro 1).

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD LARGA DE LA RUBISCO

```
VGFKAGVKDYKLTYYTPDYQTKDTDILAAFRVTPQPGVPPEEAGAAVAAE
                                                                 ** . : * *
SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCEIEPVPGEDNQFIAYVAYPLDLFEE
*****:***** . * :      ** * * . *****:*****
GSVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLEDLRIPYAYVKTFQGPPHGIQVERD
*****:***** *** *** **          * * . *****
KLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQP
* ** . * * **      * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FMRWRDRFLFCAEAIYKSQAETGEIKGHYLNATAGTCEEMLKRAVFAREL
** ** * * * * * :          *          *****:* * ****
GVPIVMHDYLTGGFTANTTLSHYCRDNGLLLHIHRAMHAVIDRQKNHGMH
* . ** :***** *****:*:***** ***** *****:***:*
FRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDYIKKDRSR
***** . ** :*****:* ***** *****:*****:***:***
GIYFTQDWVSLPGVIPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHP
** :*****:***:* * * * * * *****:*****:***** *
WGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNAI IREACKW-
***
```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la subunidad larga de la Rubisco indicando las posiciones conservadas (*) en el alineamiento múltiple con las secuencias utilizadas en el presente trabajo.

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA PEP-C

```

SIDAQLRQLVPGKVSIEDDKLIEYDALLVDRFLNILQDLHGPSLREFVQECYEVSAS-----
            .                    * :          :
DYEGKGDTTKL--GELGAKLTGLAPADAILVASSILHMLNLANLAEVQIAHRRRNSKLLK
      :      :      :      :      :      .      :      :      :      . * :      .
KGGFADEGSATTESDIEETLKRLVSEVGKSPPEEVFEALKNQTVDLVFTAHTQASARRSLL
            :      :      :      : : : : : * : : : : * : : *
QKNARIRNCLTQLNAKDITDDDKQELDEALQREIQAAFRTDEIRRAQPTPQDEMRYGMSY
            .      :      : * : : : : * :      .      : * :
IHETVWKGVPKFLRRVDTALKNIGINERLPYNVSLIRFSSWMGGDRDG-NPRVTPEVTRD
. : : * . : : * : . : . * .      *      : : * . * * * * * * : * * . *
VCLLARMMAANLYIDQIEELMFELSMWRCNDELRVRAEELHSSSGSK-V-----
. : * : : : : * : : * . . .
-----TKYYIEFWKQIPP-----

-----NEPYRVILGHVRDKLYN
            * : * : : *
TRERARHLLASGVSEISAESSFTSIEEFLEPLELCYKSLCDCGDKAIADGSLLDLLLRQVF
            . : . . . * .      *      *      :
TFGLSLVKLDIRQESERHTDVIDAITTHLGIG-SYREWPEDKRQEWLLSELRGKRPLLP
      :      . . :      . . : : : *      . : * : * * * : :
-----QPLPVVPLFERLADLQSAPASVERLFSVDWYMDRIK---GKQQVMVGYSDSGKD
      . . * * * * * : . *      : : * :      :      *      : * * * * * * *
AGRLSAAWQLYRAQEEMAQVAKRYGVKLTLFHGRGGTVGRGGPHTLAISQPP--DTIN
**      .      *      *      :      :      . : : : * * * * * : . * * * : * : . * . : :
GSIRVTVQGEVIEFCFGEEHLCFQTLQRFATAATLEHGMHPPVSPKPE-WRKLMDEMA VVA
      . : : : : .      .      *      :      .      *      : : . :
T--EEYRSVVVKEARFVEYFRSATPETEYGRMNIGSRPAKRR-PGGGITTLRAIPWIFSW
      ** : . . * :      ** * * : : * * * * : : : * * * * : . *
TQTRFHLPVWLGVGAAFKFAIDKDVRN-FQVLKE-MYNEWPFFRVTLDLLLEMFVAKGDGP
** : : ** * .      :      * . : * *      * : : *
IAGLYDELLVAEELKPFKQLRDKYVETQQLLLQIAGHKDILEGDPFLK-QGLVLRNPYI
:      :      :      *      .      :      *      :      *
TTLNVFQAYTLKRIRDPNFKVTP-QPPLSKEFADEN---KPAGLVKLNPASEYPPGLEDT
      : * * . : : *      .      .      : : :
LILTMKGIAAGMQNTG
. : : : : * : *

```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la Fosfoenol piruvato carboxilasa indicando las posiciones conservadas (*) en el alineamiento múltiple con las secuencias utilizadas en el presente trabajo.

SECUENCIA			T _m TEÓRI CA	FRAGMEN TO ESPERADO
RUBISCO Subunidad PEQUEÑA *	Directo	ATGGCTTCCTCCATCGTCTCATCCGCC	59	300
	Reverso	GTTGTCTGAAGCCAATGACTCTGATGAA	62	
Subunidad LARGA	Directo	ATCGATATCTTAGCAGCATTCCG	60	1000
	Reverso	CAAAGATCTCGGTCAAAGCAGG	63	
PEP-C	Directo	ATGAGYTAYTTYCAYGARAC	49	1000
	Reverso	CCDGARTCNGARTANCCDAYCAT	63	
Universales	Smart	TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAAGGG	63	
	Dtgaga	T ₁₈ GAGCTCTGATCAAGAGAGAGAGAGAG AGAGAG	75	
Catalasa *	Directo	CTGGAGAGAGATACCGATCCTGGGC	58	300
		GGCTTGCCAGCTTTGCTGATGAGGG	58	
Actina	Directo	CAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCG	52	400
	Reverso	CTCTGGTCTAGACCCCAATAAGCAGGAAC AGAG	60	

Cuadro 1. Secuencias de oligos de Rubisco y PEP-C indicando T_m teórica y el tamaño del fragmento.

* Oligos donados por el Dr. Roberto Ruiz Medrano y la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Laboratorio de Biología Molecular, Cinvestav, Zacatenco.

7.2 Amplificación y clonación de fragmentos de interés

El RNA total de *Parkinsonia* y *Prosopis* fue obtenido mediante el protocolo de Logemann 1987, durante su estandarización se observó que a diferencia de otras especies vegetales, que el tejido colectado debe ser inmediatamente congelado de lo contrario la calidad del material obtenido disminuye ostensiblemente observándose en el gel una mancha continua que podría corresponder con material degradado. Una vez estandarizado el protocolo se procedió a la extracción de RNA a partir de plantas mantenidas en condiciones de invernadero, la figura 3 muestra el RNA separado electroforéticamente en geles desnaturalizantes de agarosa al 1%. Se puede observar la integridad de las bandas correspondientes a la subunidad ribosomal

grande y pequeña (28 y 18s) de las especies. Para verificar la integridad del RNA de *Prosopis* y *Parkinsonia* se amplificó un fragmento de actina (fig. 4) utilizando los oligos donados por la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares (cuadro 1).

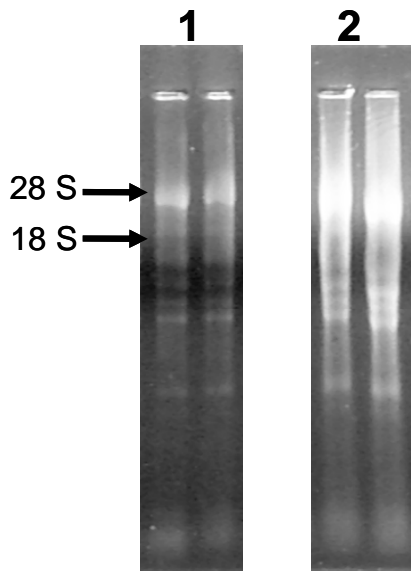


Fig. 3 RNA total de *Prosopis* (carril 1) y *Parkinsonia* (carril 2) separado en gel desnaturalizante de agarosa 1%.

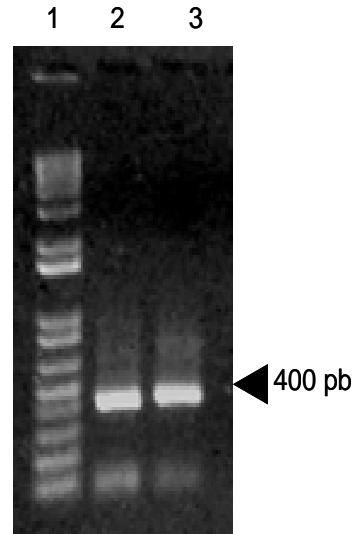


Fig. 4 Amplificación de un fragmento de actina (carril 2, *Prosopis*; carril 3 *Parkinsonia*) para verificar la integridad del RNA total de *Prosopis*.

7.2.1 Rubisco Subunidad pequeña

Se obtuvo y amplificó cDNA de la Subunidad pequeña de Rubisco (fig. 5 y 6) a partir de reacciones de reverso transcripción acopladas a PCR utilizando un gradiente de temperatura para determinar la T_m (temperatura óptima de alineamiento), la cual fue aproximadamente de 56 a 60°C para *Prosopis* y *Parkinsonia* obteniendo bandas de 300 pb las cuales coinciden con el fragmento esperado, las bandas fueron purificadas con el Kit comercial QuiaGen siguiendo el protocolo sugerido por los proveedores.

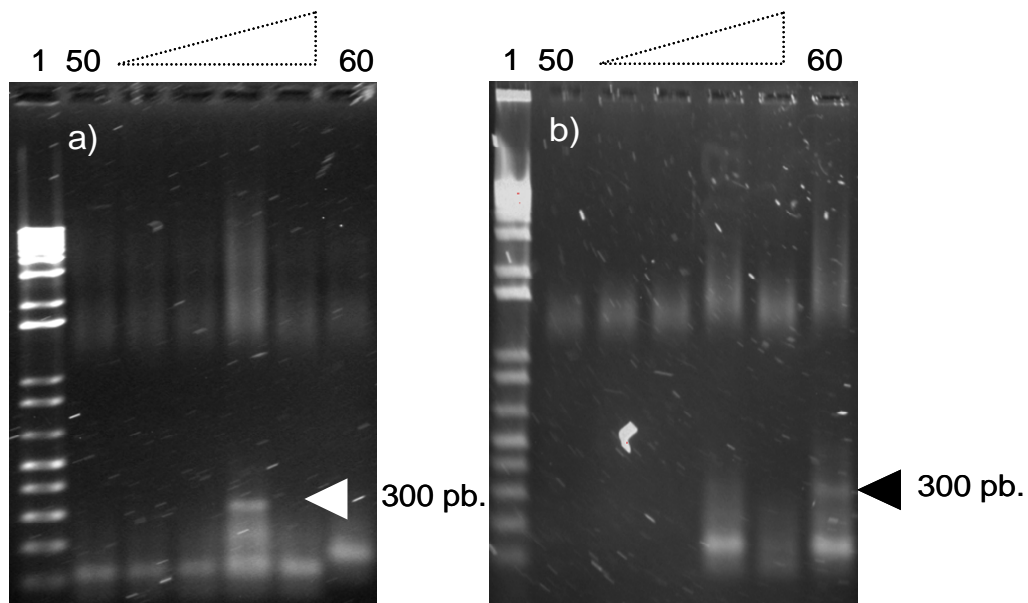


Fig 5 y 6 Producto de la amplificación de un fragmento de Rubisco subunidad pequeña a partir de cDNA de *Prosopis* (a) y *Parkinsonia* (b). Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb plus, siguientes 6 carriles productos utilizando un gradiente de temperatura (50 a 60°C). Se indica un fragmento cuyo tamaño coincide con el esperado.

PROGRAMA DE AMPLIFICACION

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min.	1
95°C	50 seg.	
50-60°C	50 seg.	
72°C	90 seg.	30
72°C	5 min.	1

Los fragmentos purificados fueron ligados a vectores de clonación comercial (pDrive, Quia Gen) y clonados en células competentes (*E. coli* DH5α) previamente preparadas en el laboratorio. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de las colonias candidatas positivas (blancas) (fig. 7 y 8) se muestran bandas de aproximadamente 3900 pb las cuales corresponden al tamaño del plásmido. Se realizó una restricción con *EcoR1* al DNA plasmídico obtenido para liberar el fragmento, sin embargo al parecer los plásmidos no contenían el fragmento de interés o la suspensión inhibió la reacción de restricción por lo que no se evidenció al fragmento esperado.

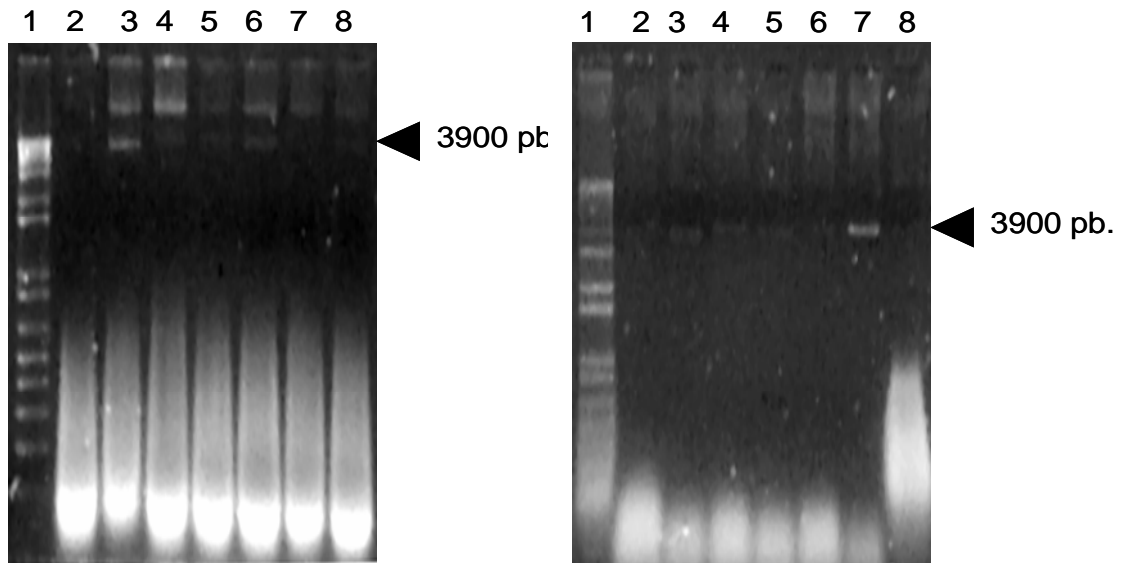


Fig. 7 y 8 DNA de plásmidos recombinantes con fragmentos de la subunidad pequeña de Rubisco de *Prosopis* (a) y *Parkinsonia* (b) Carril 1: MPM 1 Kb plus, 2, 7: plásmidos candidatos.

7.2.2 Amplificación de la Subunidad larga de la Rubisco

En la figura 9 se muestra cDNA amplificado por PCR de la subunidad larga de Rubisco de *Parkinsonia* (carriles 2-5) y *Prosopis* (carriles 6-8) utilizando el mismo programa que en Rubisco subunidad pequeña, el tamaño del fragmento esperado es de 1000 pb. (*Prosopis*), sin embargo también se observan bandas de 300 pb para ambas especies. La T_m óptima fue de 56 a 60°C para ambas especies.

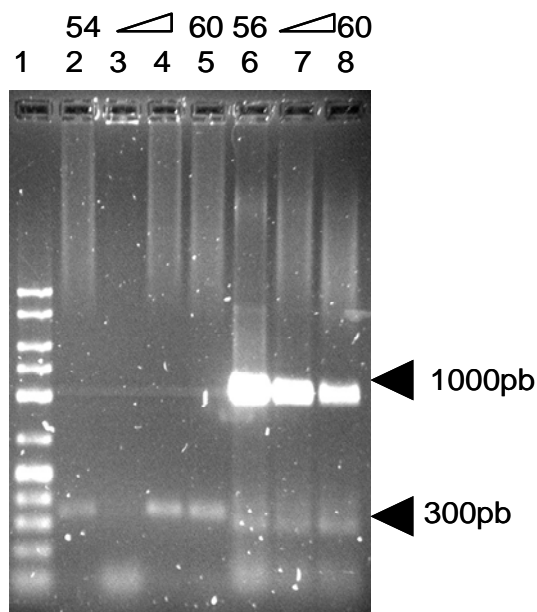


Fig. 9. Producto de amplificación por PCR de un fragmento de la Subunidad larga de la Rubisco a partir de cDNA de *Parkinsonia* (carril 2,5) y *Prosopis* (carriles 6,8). En la parte superior se indican las temperaturas de alineamiento utilizadas.

Los fragmentos obtenidos también fueron purificados y ligados a vectores comerciales y clonados. La figura 10 muestra los plásmidos recombinantes con fragmentos de rubisco larga de *Prosopis* (carriles 2-4) y *Parkinsonia* (carriles 5-8), se observan bandas de 3900pb correspondientes al tamaño del plásmido. En la figura 11 se observa producto de la digestión de las clonas candidatas positivas de *Prosopis* (carriles 2 y 4) y *Parkinsonia* (carriles 6 y 8).

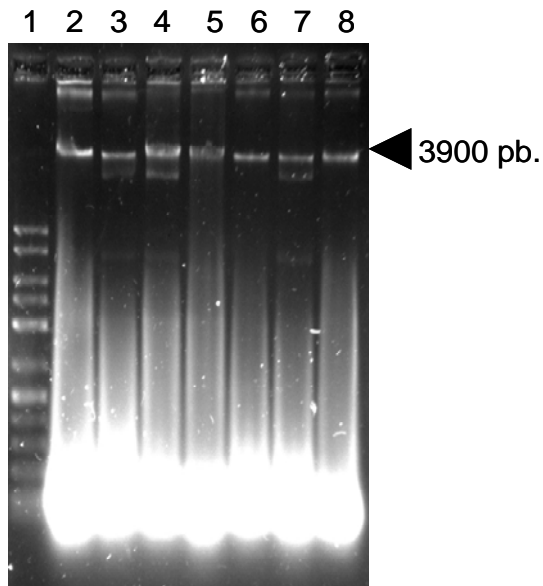


Fig. 10 Plasmidos recombinantes de Rubisco larga de *Prosopis* (carriles 2,4) y *Parkinsonia* (carriles 5,8).

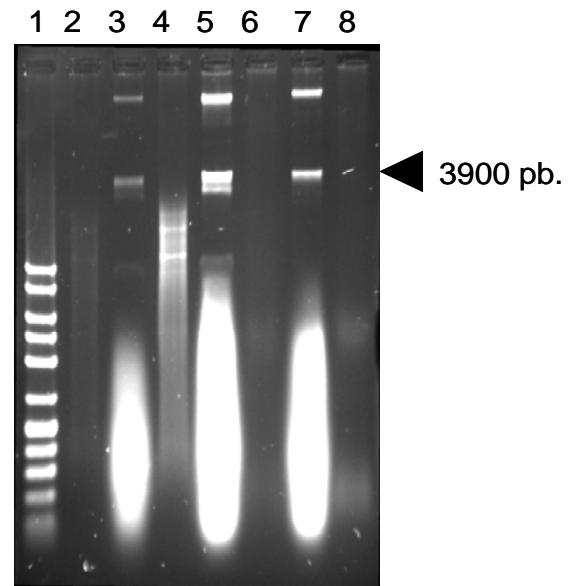


Fig. 11 Digestión con EcoR1 de los plásmidos candidatos positivos *Prosopis* (carriles 2,4) y *Parkinsonia* (6,8).

Cabe mencionar que en el proceso de purificación de los fragmentos se pierde una importante cantidad de DNA obteniendo de 3 a 5 ng/ μ l reduciendo las posibilidades de incorporación del fragmento de interés en el vector.

7.2.3 Amplificación de la Subunidad pequeña de Rubisco a partir de LDs

Debido a las dificultades presentadas en la caracterización de los fragmentos, se utilizaron LDs obtenidos por Rojas-Martínez y Velez-Ramírez a partir de RNA total utilizando los iniciadores SMART y dTgaga (cuadro 1) con los cuales realizaron reacciones de PCR para enriquecer los mensajeros (fig. 12 y 13). A partir de estos LDs se amplificaron fragmentos de DNA de Rubisco subunidad pequeña, en la figura 14 se observan bandas de 300 y 1000 pb con Tm 56 y 60°C para ambas especies (*Prosopis* carriles 2,3; *Parkinsonia* carriles 3,4).

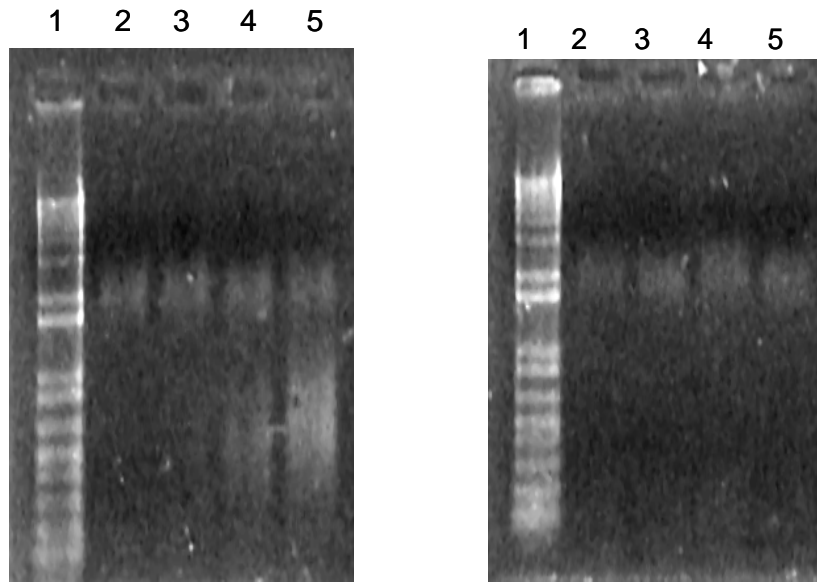
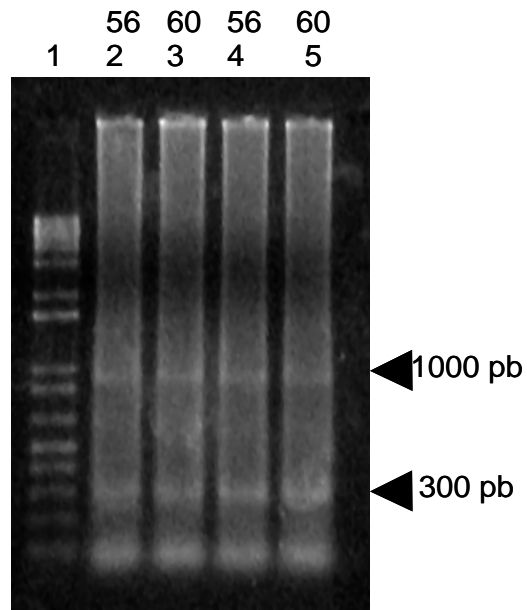


Fig. 12 y 13 Productos de reacciones LD PCR de *Prosopis* (izquierda) y *Parkinsonia* (derecha) separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Carril 1 MPM 1kb Plus, carriles 2-5 productos LDs



Utilizando el mismo protocolo se obtuvo el DNA plasmídico de candidatas positivas a contener un fragmento del gen que codifica la subunidad pequeña de Rubisco en *Prosopis* (fig. 15) y *Parkinsonia* (fig. 16) mostrando bandas de 3900pb del tamaño del plásmido.

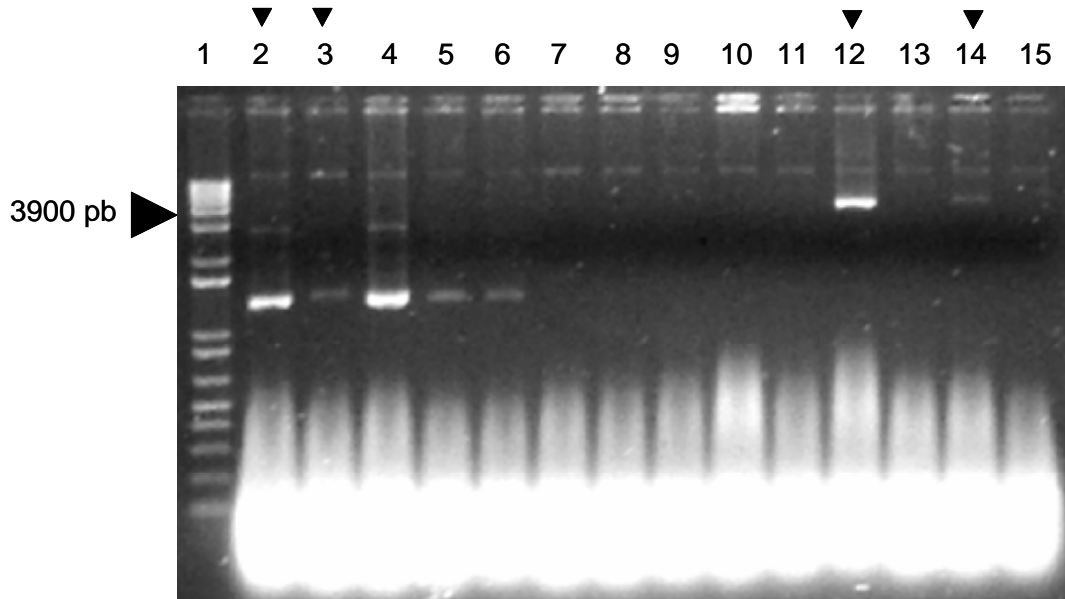


Fig. 15 DNA de plásmidos (pDrive) recombinantes (Rbcs) con un fragmento de la subunidad pequeña de la Rubisco de *Prosopis*, carril 1 MPM 1Kb plus, carriles 2-15 plasmidos. Se seleccionaron las clonas candidatas positivas para secuenciar.

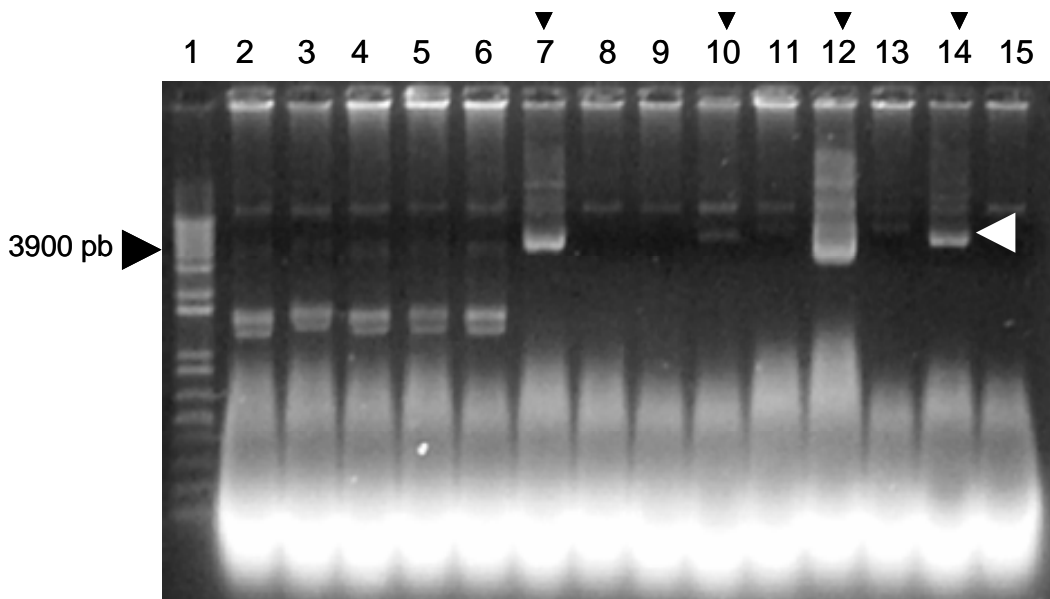


Fig. 16 DNA de plásmidos (pDrive) recombinantes (Rbcs) con un fragmento de la subunidad pequeña de la Rubisco de *Parkinsonia*, carril 1 MPM 1Kb plus, carriles 2-15 plasmidos. Se seleccionaron las clonas candidatas positivas para secuenciar.

Para verificar la presencia del inserto se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores Sp6 y T7 que flanquean el sitio de ligación. Los resultados se muestran en la figura 17, a partir de la clona 7 de *Parkinsonia* se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb de (carril 2), mientras de las clonas 12 y 14 de *Prosopis* se amplificaron fragmentos de 400 pb. (carriles 3-6), posteriormente las clonas fueron purificadas (fig. 18) con el Kit QuiaGen, los productos fueron cuantificados y corridos en gel de agarosa para verificar la integridad del DNA, posteriormente se mandaron secuenciar para su análisis posterior.

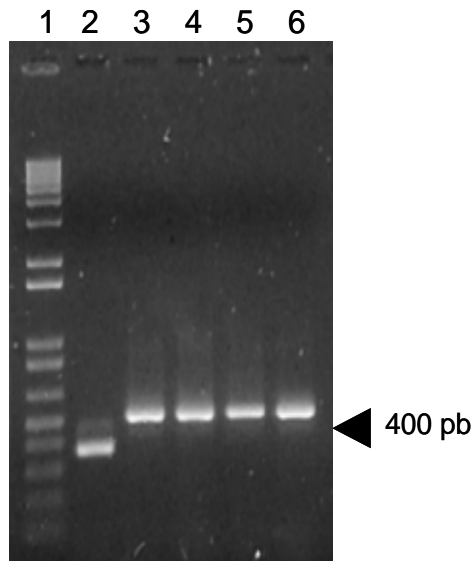


Fig. 17 Amplificación del fragmento clonado que posiblemente pertenezca a Rubisco corta de *Parkinsonia* (carril 2: clona 7) y *Prosopis* (carriles 3 y 4 :clona 12; 5 y 6:clona 14)

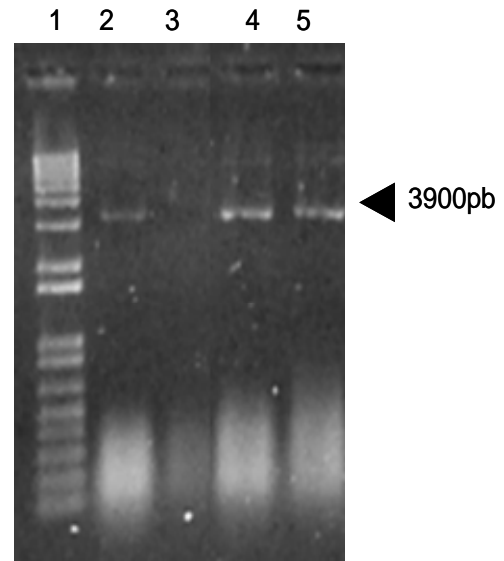
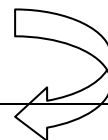


Fig. 18 Purificación de clonas positivas de *Parkinsonia* (carril 2) y *Prosopis* (carriles 3-5)

PROGRAMA DE AMPLIFICACION POR PCR UTILIZANDO INICIADORES SP 6 y T7

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min.	1
94°C	45 seg.	
55°C	45 seg.	
72°C	50 seg.	22
72°C	7 min.	1



7.2.4 Análisis de las secuencias obtenidas de la Subunidad pequeña de Rubisco de *Prosopis* y *Parkinsonia*, la secuencia subrayada corresponde a los iniciadores directo y reverso.

Prosopis

ATGGCTTCCTCCATCGTCTCATCCGCCCCCGTCATACAATCTAAGCATTTTGTTTTTGTTATACCATTGATA
ATCCCAGGATTCATTTCGGATTAGGGGCTTTCTTGGTTTCCGTCTTCACGATATCACGGAACATCGGATTAT
GAAGCGCATAAGCCGTCAGCT**TCATCAGAGTCATTGGCTTCGACAACA**

Parkinsonia

ATGGCTTCCTCCATCGTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCTGACTCTAGAGGATC
TATCACTCCTTGGCGGAGAGCCAGTCCTCCCCTATCCCACCTCCACCTCCAGGGGCACGGCCAGGGGATA
CACCCCCTCCATGACCTCCTTGGCCAGCCGGGCCACGGCCTCCGCCCTCTCTTTTGGGGTTTCTAGGACCA
GCTCGTCTGGACCTGAATTANCATCCTGGCCCCCATTTCTCCAGCCTGGGGAAGAGCTTCACCATAGCC
AGCTTCATGAGGTCCGCGGATGAGACGATGGAGGAAGCNATAATCTGAATTNGTGGACAAGCTTCNCGAGG
CTAGGNTAGCTCTAGACCACNCGTGTGGGGGCCGAGCTCGCGGCCGCTGAATTCTANAGTGTCTCANCTAAA
TGA

Se utilizó el sitio Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) para obtener la traducción en los 6 marcos de lectura de las secuencias y posteriormente se usó el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar secuencias homólogas a la secuencia de aminoácidos en los distintos marcos de lectura. Los resultados indican que las secuencias obtenidas a partir de ambas especies presentan identidad de 80% con una secuencia de 26 residuos de una dehidrina o LEA tipo II reportada en *Medicago sativa*.

Resultado de la comparación (BlastN) del fragmento recombinante en bancos de información genética

> [emb|CAJ44125.1](#) LEA dehydrin-like protein [*Medicago sativa* subsp. *falcata*]
Length=26

Score = 39.7 bits (91), Expect = 0.047, Method: Composition-based stats.
Identities = 22/26 (84%), Positives = 22/26 (84%), Gaps = 0/26 (0%)

Query 9 SGRELGPPHXWSRAXLASXSLSTNSD 34
SGRELGPPH WSRA L S SLSTNSD
Sbjct 1 SGRELGPPHVWSRASLGSRSLSSTNSD 26

Las dehidrinas son parte de un amplio grupo de proteínas hidrofílicas conocidas como proteínas LEA del grupo II, estas son acumuladas durante la embriogénesis tardía, se localizan en casi todos los tejidos verdes durante condiciones de crecimiento normal y en respuesta al estrés llevando a la deshidratación celular (sequía, temperaturas bajas y salinidad) y durante el proceso natural de deshidratación que ocurre durante la maduración y el secado de la semilla.

No se ha establecido bien su función pero experimentos *in vitro* relevan que cada tipo de dehidrina puede tener una función específica. Se sabe que algunas dehidrinas están involucradas en la eliminación de radicales hidroxilo, protegen la membrana lipídica contra de peroxidación, otras facilitan la aclimatación de la planta al frío (Rorat, 2006).

Dado que no se logró caracterizar fragmentos de la Subunidad larga de la Rubisco y PEPC se optó por la caracterización de fragmentos de otras enzimas también involucradas en la respuesta de la planta al estrés como catalasa.

7.2.5 Catalasa

El déficit de agua es uno de los factores que limitan el establecimiento y la sobrevivencia de las plantas afectando sus actividades metabólicas, una de las primeras respuestas es la producción de especies oxígeno reactivas que tienen efecto deletéreo sobre el funcionamiento y e integridad de las células. Para ello la planta posee adaptaciones bioquímicas tales como la regulación de la actividad de enzimas antioxidantes tales como SOD (Superoxido dismutasa), Apx (ascorbato peroxidasa) y Catalasa las cuales juegan un rol importante en la protección de la planta al estrés para reducir el daño oxidativo en las células, reaccionando con formas activas de oxígeno siendo capaces de mantener estas en bajos niveles (Marulanta *et al.*, 2007). Se ha encontrado que la actividad de las enzimas antioxidantes es modificada bajo estrés salino. Gueta-Dahan *et al.*, en 1997; Mittova *et al.*, en 2004 realizaron estudios en tomate y cítricos encontrando que la tolerancia a la salinidad es atribuida al incremento de algunas enzimas antioxidantes como SOD, Apx y Catalasa. Kim *et al.*, en 2005 sometieron a estrés con NaCl a *Hordeum vulgare* (cebada), planta relativamente tolerante a estrés salino para conocer la actividad de las enzimas como catalasa y analizar la expresión de las isoformas en respuesta al estrés, encontrando que la actividad de catalasa se incrementa en brotes y raíz presentando un incremento drástico en esta última. Se encontraron 2 isoformas (CAT 1 y CAT2), en raíz se observó un incremento consistente de CAT 1 durante el estrés, mientras que CAT 2 solo se expresó en el quinto día del tratamiento. Según Kim *et al.*, el incremento en la actividad de la enzima puede indicar que la catalasa es un detoxificante del peróxido de hidrógeno bajo estrés salino en esta especie. Se ha demostrado que mutantes de cebada deficientes de catalasa muestran severas lesiones necróticas (Acevedo *et al.*, 2001) esto parece sugerir que la actividad de enzimas como catalasa son fundamentales para que las plantas toleren el estrés.

Para caracterizar fragmentos de catalasa de *Prosopis* y *Parkinsonia* se utilizaron productos de LD-PCR obtenidos por Rojas-Martinez y Velez-Ramirez e iniciadores donados por la Dra. Beatriz Xoconostle, Cinvestav, Zacatenco. La figura 19 muestra el producto de esta amplificación. La T_m fue aproximadamente de 56 a 60°C. La figura 20 muestra los los fragmentos purificados de *Prosopis* (carriles 2 y 3) y *Parkinsonia* (4 y 5) los cuales fueron ligados a pDrive y clonados en células competentes.

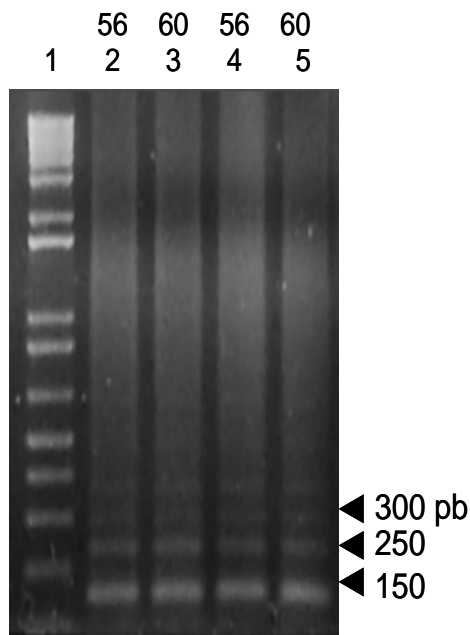


Fig. 19 Amplificación de fragmentos de catalasa de *Prosopis* (carriles 2, 3) y *Parkinsonia* (carriles 4, 5) con T_m de 56-60°C.

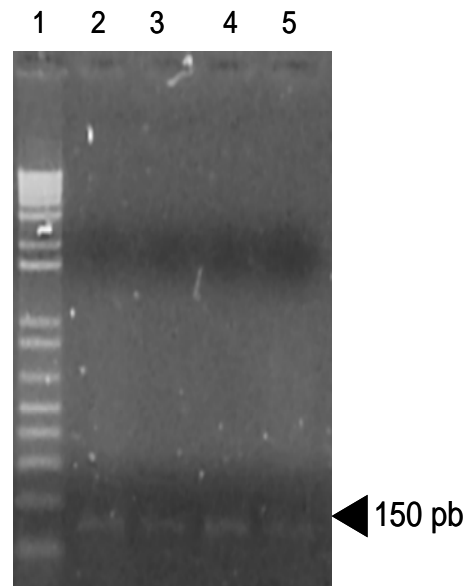


Fig. 20 Purificación de los fragmentos amplificados de catalasa de *Prosopis* (carriles 2, 3) y *Parkinsonia* (carriles 4, 5)

En la figura 21 se muestra el DNA plasmídico de las clonas candidatas a contener un fragmento de catalasa los cuales se sometieron a reacciones de PCR utilizando los iniciadores SP6 y T7 para amplificar el fragmento ligado (figura 22). Se seleccionaron 2 clonas las cuales fueron purificadas, los productos fueron cuantificados y corridos en gel (figura 23), posteriormente se mandaron secuenciar para su análisis posterior.

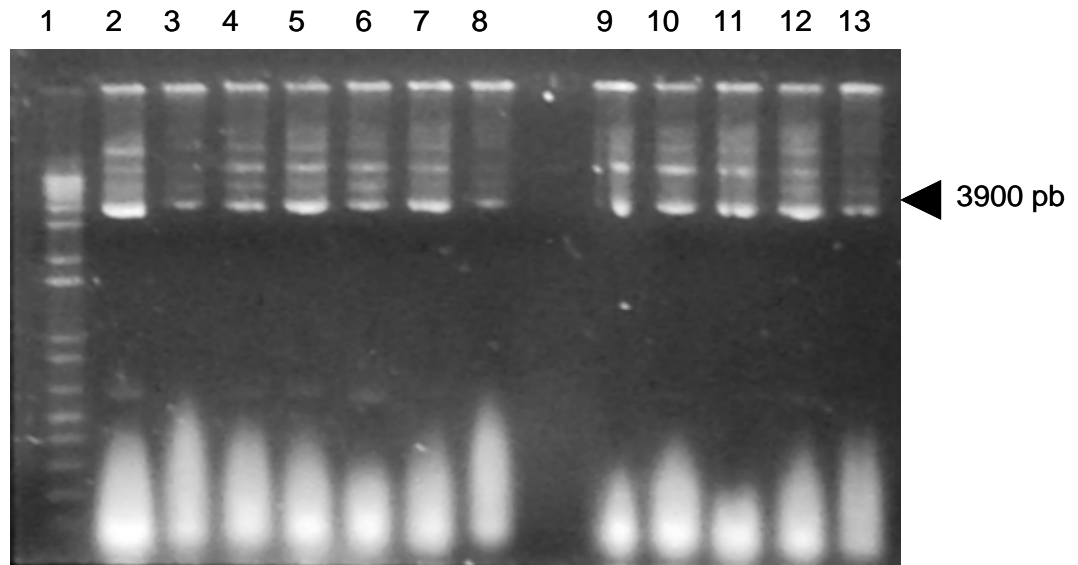


Fig. 21 Plásmidos recombinantes con un fragmento amplificado a partir de *Prosopis* (carriles 2-8) y *Parkinsonia* (carriles 9-13).

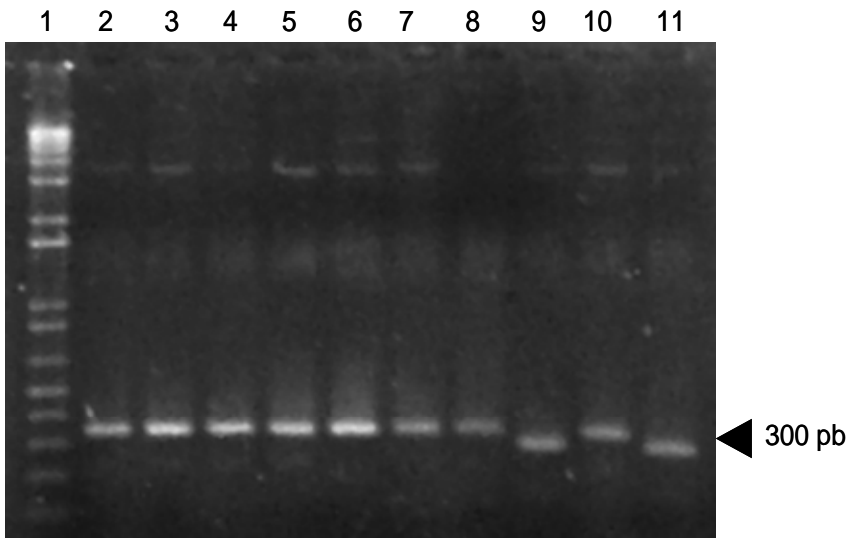


Fig. 22 Amplificación del fragmento recombinado en los plásmidos candidatos utilizando los iniciadores SP6 y T7. Carril 1 MPM, carril 2 al 6 fragmento *Prosopis* y carriles 7 al 11 fragmento de *Parkinsonia*.

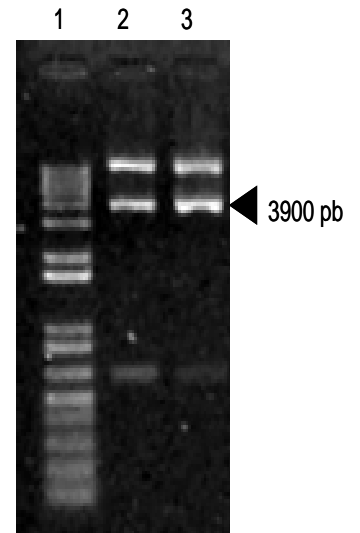


Fig. 23 Purificación de plásmidos candidatos positivos de *Prosopis* (carril 2) y *Parkinsonia* (carril 3).

7.3 Inferencias filogenéticas utilizando secuencias de la subunidad larga de la Rubisco depositadas en los bancos de información genética

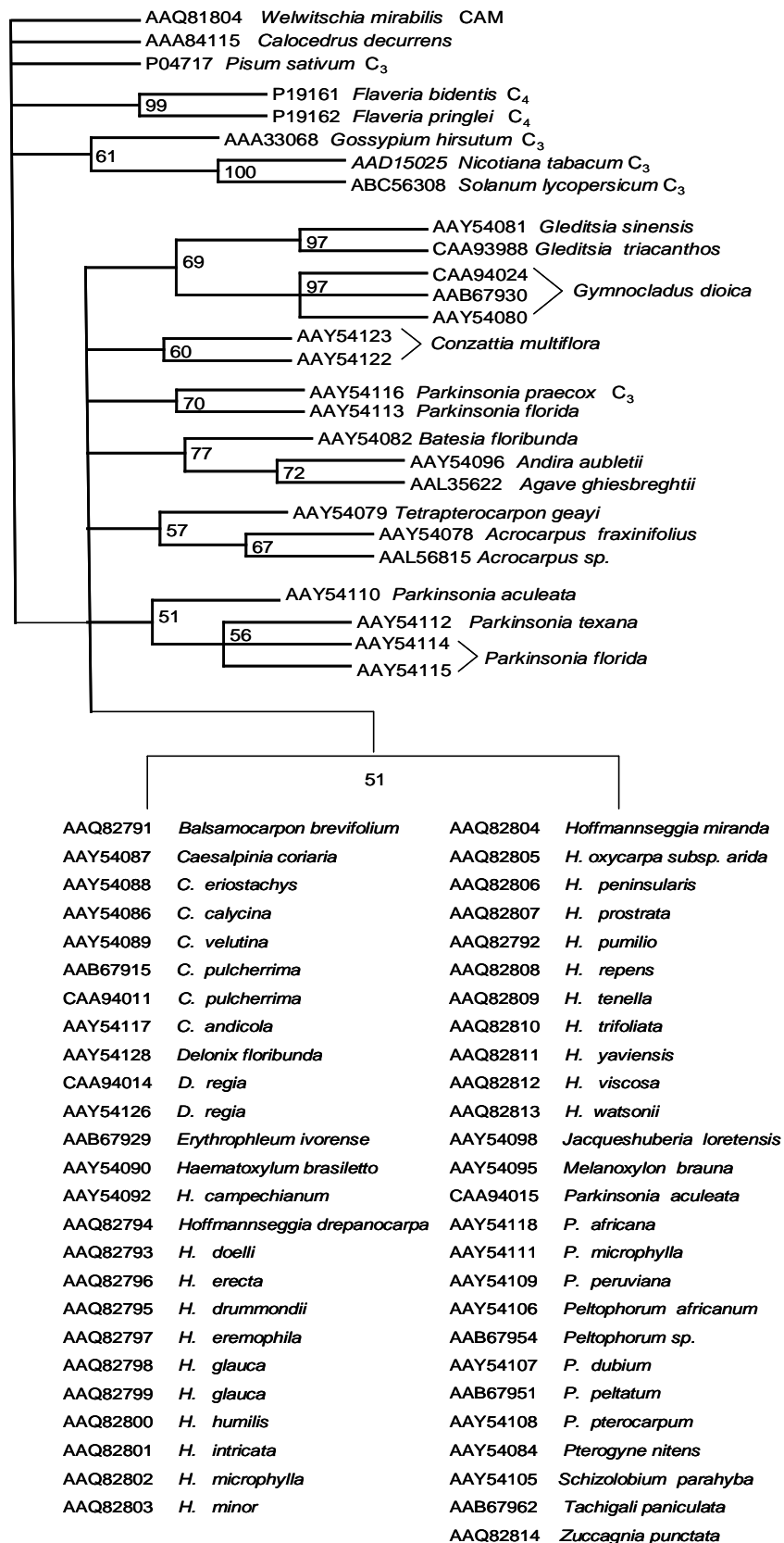
7.3.1 Generalidades de la enzima

La holoenzima posee una masa molecular de 560 kDA, está constituida por subunidades largas (rbcL) y cortas (rbcS), las primeras están codificadas por el gen rbcL del cloroplasto de plantas terrestres y algas verdes, tienen una masa molecular de 55 kDA y poseen el sitio catalítico de la enzima. Por su parte, una familia de genes nucleares codifica las subunidades cortas que poseen una masa molecular de 15 kDA, las cuales se adicionan a las largas formando al menos dos tipos de complejos: la forma I presente en plantas superiores, algas y protobacterias autótrofas, está compuesta de 8 subunidades largas y 8 pequeñas y la forma II, constituida por un dímero de subunidades largas, se presenta en algunos procariontes y dinoflagelados. Adicionalmente se han reportado variantes entre las cuales encontramos la de algunas algas que está constituida por 8 unidades L y S codificadas por el genoma del cloroplasto, así como la Rubisco reportada en Arqueobacterias (Spreitzer, 2002) constituida solamente por 5 dímeros de unidades L (Forma III) (Ashida, *et al.*, 2003). Algunos autores designan a las formas III y IV como proteínas “semejantes a Rubisco” dado que, al parecer, estas enzimas no participan directamente en el ciclo de Calvin. Específicamente el grupo IV carece de varios residuos que son requeridos para la actividad catalítica de la Rubisco y parecen estar involucradas en la recuperación de metionina, mientras que la forma III no ha sido relacionada con funciones metabólicas específicas (Ashida *et al.*, 2003).

Análisis bioquímicos y moleculares han determinado que el sitio activo de la Rubisco se forma mediante la interacción de dos subunidades largas. La interacción entre esas subunidades se da entre los residuos del loop que conecta el extremo Carboxilo de las β plegadas y el extremo amino de la α hélice en el barril α/β de una subunidad con el dominio del extremo amino de la otra subunidad formado por 4 láminas β antiparalelas (Hudson *et al.*, 1990). 4 subunidades pequeñas se unen a cada uno de los extremos de 4 pares de subunidades largas asociadas, cada una de las subunidades pequeñas interactúa con 3 subunidades largas. El origen y el papel de las subunidades pequeñas forma I permanecen desconocidas dado que las enzimas forma II (que carecen de subunidades pequeñas) contienen todos los elementos estructurales para la catálisis (Spreitzer, 2002).

En la figura 24 se muestra el árbol filogenético construido mediante un modelo de máxima parsimonia utilizando 78 secuencias de aminoácidos correspondientes a la subunidad larga de RuBisCO disponibles en el banco de información genética (www.ncbi.com del National Center for Biotechnology Information). Los alineamientos múltiples muestran que de aproximadamente 485 residuos, 379 son sitios conservados y solo 106 sitios variables, los números de acceso de las secuencias se presentan en los nodos terminales y se enlistan en el apéndice I. El valor numérico anotado en las ramas intermedias corresponde con resultado del análisis bootstrap, La estructura del árbol muestra 8 grupos definidos (clados) y una politomía de 51 secuencias. Del total de las 78 secuencias, 69 corresponden a 23 géneros de la familia *Fabaceae*, tribu *Caesalpinieae*; las 9 secuencias restantes pertenecen a las familias *Agavaceae* (1 secuencia), *Asteraceae* (2), *Cupressaceae* (1), *Malvaceae* (1), *Solanaceae* (2) y *Welwitschiaceae* (1).

Figura 24 Árbol filogenético enraizado construido con la secuencia de aminoácidos de la subunidad larga de la Rubisco mediante el modelo de máxima parsimonia. En las ramas terminales se indican los números de acceso de las secuencias, la especie y en algunos casos, el tipo fotosintético, en las ramas intermedias se indica el valor bootstrap obtenido en un análisis con 1000 iteraciones.



7.3.2 Análisis e inferencias evolutivas del árbol filogenético.

La secuencia de *Welwischia mirabilis* (AAQ81804 Won y Renner, 2003) se utilizó para enraizar el árbol, de acuerdo a la evolución de las plantas, *W. mirabilis* es una gimnosperma relativamente antigua, su secuencia de Rubisco posee un ancestro del que se derivan el resto de las secuencias aquí analizadas, cercanas a esta se encuentran *Calocedrus decurrens* (AAA84115 Gadek y Quinn, 1993), y *Pisum sativum* (P04717, Zurawski *et al.*, 1986). *Calocedrus decurrens* es un especie que crece en suelos húmedos, al igual que *W. mirabilis* pueden vivir mucho tiempo (1000 años). *Pisum sativum* a diferencia del resto de las secuencias de *Fabaceae*s analizadas aquí ha acumulado menos mutaciones respecto de *C. decurrens* y *W. mirabilis*. La distancia p para estas secuencias es de 0.054 mostrando un grupo compacto con solo 36 sustituciones de un total de 525 aminoácidos.

El clado I está apoyado por bootstrap de 99 y está integrado por solo dos secuencias de *Asteraceae*, *Flaveria bidentis* (P19161 Hudson *et al.*, 1990) y *Flaveria pringlei* (P19162, Hudson *et al.*, 1990) Hudson y colaboradores 1990 examinaron las propiedades de la rubisco en los géneros *Flaveria*, *Atriplex* y *Neurachne* los cuales contienen especies C_3 , C_4 y especies intermedias C_3 - C_4 a fin de buscar los posibles cambios en secuencias que codifican a la proteína, así como las regiones promotoras del gen *rbcl* ocurridos durante la evolución de las plantas C_4 . Encontrando de 3 a 6 sustituciones, de las cuales la sustitución Met por Ile (C_3 y C_4 respectivamente) localizada en la posición 309 es observada consistentemente en los tres géneros, mientras que la región promotora (70pb aproximadamente) es muy conservada, por lo que concluyen que la región que codifica a la proteína acumuló las sustituciones posiblemente involucradas en la afinidad por el CO_2 (Andersson *et al.*, 1989 citado en Hudson *et al.*, 1990). Hasta el momento se han realizado pocos estudios de esta subunidad por lo que se requiere un análisis funcional de la regulación de la expresión.

El clado II está apoyado por bootstrap de 61 y contiene tres secuencias, dos de la familia *Solanaceae*, *Nicotiana tabacum* (AAD15025, Shinozak *et al.*, 1982) y *Solanum lycopersicum* (ABC56308, Daniel, 2006), estas secuencias poseen un ancestro común del que también se originó AAA33068 de *Gossypium hirsutum*. La distancia p entre las secuencias de este clado es 0.041 producto de 29 sitios variables de 525 comparados. La rubisco es altamente conservada en el reino vegetal, las plantas C_3 y C_4 poseen mecanismos que regulan la expresión distintos, aunque el análisis realizado por Hudson *et al.*, no reporta diferencias en los sitios reguladores localizados en la región upstream inmediata, Shinozaki y Sugiura en 1982 realizaron estudios

de expresión diferencial en tabaco que mostraron que en plantas C_3 la rubisco es sintetizada constitutivamente en las células del mesófilo de plantas C_3 , mientras que en plantas C_4 sólo las células del haz de la vaina contienen rubisco en altas cantidades, confirmando de esta manera lo que previamente había observado Huber *et al.*, 1976 y Kirchanski y Park, 1976 citados en Shinozaki. Por otra parte también cita Shinozaki, Link *et al.* en 1978 mostraron que en maíz las células del mesófilo y del haz de la vaina contienen el gen de la subunidad larga de la rubisco, sin embargo el RNAm sólo es abundante en las células del haz de la vaina. Para estudiar el mecanismo de transcripción diferencial Shinozaki y Sugiera compararon la secuencia de nucleótidos en tabaco, espinaca y maíz encontrando que las secuencias en tabaco y espinaca (especies C_3) son muy similares entre sí y son similares a secuencias promotoras de procariontes (la secuencia TACAATA entre la posición -186 y -192, es similar a la secuencia pribnow TATRATR de procariontes y la secuencia GTTG entre la posición -214 y -217 es similar a la secuencia GTTGACA. Por otro lado, en maíz (C_4) la secuencias TATCATT entre la posición -104 y -97 y GTTCATA entre -120 y -114 pb es similar a la región -35 de caja pribnow. Las 2 secuencias palíndromes encontradas en las regiones promotoras de espinaca y tabaco, no se encuentran en maíz y viceversa, estas diferencias pueden jugar algún rol en la transcripción diferencial del gen en plantas C_3 y C_4 . De tal manera que es necesario realizar estudios de las secuencias upstream de los genes de la rubisco en un rango de especies más amplio para establecer si las propiedades observadas por Shinozaki son aplicables a otros grupos de plantas.

La mayoría de las secuencias analizadas en este trabajo pertenecen a especies de la familia *Fabaceae*, la cual se distribuye ampliamente en regiones templadas y tropicales del mundo (Rundel, 1989) y es la segunda familia más importante comercial y económicamente, incluye gran cantidad de especies domesticadas para el consumo animal y humano como aceites, fibras, fertilizantes, medicinas, químicos y variedades hortícolas (Lewis *et al.*, 2005); además compone la mayor parte de los tipos de vegetación de todo el mundo (Rundel, 1989). Las leguminosas son particularmente diversas en bosques tropicales y climas estacionales áridos o secos, su preferencia a ambientes áridos y semiáridos está relacionada a su metabolismo demandante de nitrógeno, posiblemente una adaptación a la variación climática donde las hojas se pueden producir económica y oportunamente (McKey, 1994). El estudio de la biología y clasificación de las leguminosas ha servido para entender la morfología, sistemática y ecología de la familia (Polhill, 1994; Lewis *et al.*, 2005). Taxonómicamente, la familia *Fabaceae* ha sido dividida en tres subfamilias: *Caesalpinioideae* (a la cual pertenecen la mayoría de las

secuencias aquí analizadas), *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, clasificación basada sobre las características de la flor, complejidad de la hoja y presencia de nódulos de raíz. Los estudios filogenéticos de la subfamilia *Caesalpinioideae* han mostrado relaciones que no están acorde con la clasificación más usada de las leguminosas.

Las secuencias de la familia *Fabaceae* se agrupan en un gran clado, dividido en 6 subgrupos y una politomía. El subgrupo I, esta apoyado por bootstrap de 69 y contiene 2 ramas, la primera integrada por tres secuencias, dos de *Gymnocladus dioica* (AAY54080 y CAA94024, Haston, 2005; AAB67930, Doyle *et al.*, 1977), especie que crece preferentemente en suelos salinos y alcalinos; la otra rama contiene 2 secuencias de *Gleditsia triacanthos* (CAA93988, Haston, 2005) especie tolerante a sequia y salinidad; y *Gleditsia sinensis* (AAY54081, Haston, 2005). La distancia p (0.014 con solo 11 sitios variables) indica que esta proteína ha variado muy poco en este grupo.

El subgrupo II esta apoyado por bootstrap de 60 y contiene únicamente dos secuencias de *Conzattia multiflora* (AAY54123 y AAY54122, Haston, 2005), especie nativa de México y a diferencia de otras leguminosas presenta nódulos en el tronco, en los cuales no se encontró rizobia, sino una enterobacteria endofítica de la que no se conoce su verdadera función (Wang, 2006). La distancia p es de 0.05 con 2 sitios variables

El subgrupo III esta apoyado por bootstrap de 70 y agrupa dos secuencias, *Parkinsonia praecox* (AAY54116, Haston, 2005) y *Parkinsonia florida* (AAY54113, Haston, 2005) llamada comúnmente palo verde azul, localizada en el desierto sonorense. *P. praecox* es una leguminosa de la familia *Caesalpinaceae* y de acuerdo al análisis anatómico y fisiológico realizado por Flores *et al.*, 2004 esta especie posee fotosíntesis C₃; el tallo verde realiza la fotosíntesis cuando no hay hojas en la época de sequía, *P. praecox* forma islas de fertilidad al crear condiciones ambientales benéficas para otros componentes del ecosistema por lo que se le considera como una especie clave para la reforestación y rehabilitación de suelos degradados. Por lo tanto, se le ha considerado junto con algunas especies de la familia de las leguminosas como plantas potencialmente rehabilitadoras y abundantes en el Valle de Tehuacan (Dávila *et al.*, 1993 citado en Labrada, 2005). La distancia genética para este subgrupo es de 0.008 con solo 5 sustituciones de aminoácidos.

El subgrupo IV esta apoyado por bootstrap de 77 y esta integrado por 3 secuencias, una de las cuales pertenece a la familia *Agavaceae*, *Agave ghiesbreghtii* (AAL35622, Soltis, 1999). Esta secuencia esta agrupada con *Andira aubleti* (AAY54096, Haston, 2005); ambas secuencias poseen un ancestro común del cual diverge también la secuencia de *Batesia floribunda* (AAY54082, Haston, 2005). La distancia para este subgrupo es de 0.031 mostrando 22 sitios variables sugiriendo un grupo compacto, el agave exhibe adaptaciones a ambientes secos, tales como la formación de hojas arosetadas suculentas que capturan el agua y mantienen un sistema extensivo de raíces (Good *et al.*, 2006)

El subgrupo V esta apoyado por bootstrap de 57 y contiene 3 secuencias, dos pertenecen a *Acrocarpus sp.* (AAL56815 Kajita *et al.*, 2001) *Acrocarpus flaxinifolius* (AAY54078 Haston, 2005), también llamada cedro rojo, esta especie crece en suelos ácidos y calcáreos en estas secuencias poseen un ancestro común del cual divergió *Terapterocarpon geayi* (AAY54097). La distancia genética intragrupal es de 0.003 mostrando sólo 3 sustituciones de aminoácidos

El subgrupo VI esta apoyado por bootstrap de 51 y contiene 4 secuencias del género *Parkinsonia* reportadas Haston, 2005, *P. texana* (AAY54112) y dos de *P. florida* (AAY54114, AAY54115) estas secuencias poseen un ancestro del que también se originó *Parkinsonia acuelata* (AAY54110). La distancia genética para este clado es de 0.002 con solo 1 sustitución. La distancia genética respecto del clado III donde se encuentra *P. praecox* y *P. florida* es de 0.010, mientras que las que se encuentran en la politomía presenta un distancia p de 0.007.

Cuadro 2 Distancias genéticas de las secuencias de especies del género *Parkinsonia*

Dentro del grupo		Entre grupos		
Subgrupo VI	0.002		VI	Politomía
Politomía	0.007	Pol	0.011	
subgrupo III	0.008	III	0.010	0.010

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 385 sitios de las 9 secuencias distribuidas en: grupo 1, 3 secuencias, 2, 3 y grupo 3, secuencias

La politomía contiene 51 secuencias de la familia *Fabaceae*, de las cuales 5 pertenecen a especies del género *Caesalpinia*, 2 especies al género *Delonix*, 2 especies al genero *Haematoxylum*, 4 al genero *Parkinsonia*, 5 al grupo *Peltophorum* y 23 especies al genero

Hoffmannseggia; mientras que los géneros *Balsamocarpon*, *Melanoxylon*, *Jacqueshubiera*, *Erithrophleum*, *Pterogyne*, *Schizolobium*, *Tachigali*, *Zuccagnia* solo poseen a una secuencia, la distancia p para todas las secuencias de esta politomía es de 0.012 mostrando solo 59 sitios variables. En este árbol filogenético las secuencias no agrupadas presentan un bajo valor de bootstrap (51). Se utilizó el programa MEGA para analizar los alineamientos de las secuencias de este árbol, mostrando que de los 487 aminoácidos, sólo 54 sitios son parsimoniosamente informativos, lo que puede explicar la poca estructuración del árbol. Rubisco posee importancia funcional elevada, se encarga de la fijación de CO₂, por lo que su secuencia está altamente conservada (figura 1), de esta manera se deriva que cualquier alteración arriesgaría el éxito de la planta; por lo tanto la conservación en la secuencia no permite vislumbrar las relaciones filogenéticas a través de un modelo de máxima parsimonia. Sin embargo Haston *et al.*, 2005 aplicaron el método Bayesiano, secuencias del gen rbcL y datos morfológicos a fin de obtener árboles estructurados con la finalidad de reclasificar al grupo *Peltophorum* (el cual contiene 8 géneros) y esclarecer las relaciones filogenéticas del grupo.

7.3.3 Búsqueda de la firma RUBISCO-LARGE en las secuencias analizadas

Esta enzima cataliza el paso de la carboxilación en el ciclo calvin en la fijación de dióxido de carbono, un proceso que almacena la energía atrapada por fotosíntesis y también cataliza el paso inicial de oxigenación en la fotorespiración, durante el cual una suma considerable de energía almacenada es convertida a calor limitando por ello el rendimiento de la producción; ambas actividades catalíticas requieren de un proceso de activación durante el cual un residuo de lisina reacciona con una molécula activadora de CO₂. El carbamato formado en esta es estabilizado por un ion magnesio, el sustrato 1,5 ribulosa bifosfato es carboxilado por CO₂ u oxigenado por O₂. Estas dos reacciones ocurren en el mismo sitio de la proteína (G - x - [DN] - F - x - K - x - D - E). Con la finalidad de establecer el grado de divergencia entre las secuencias analizadas en este trabajo, se utilizaron los programas disponibles en el sitio [PROSITE](#), los resultados se presentan en el apéndice I. La mayoría de las secuencias presentan la firma GIDFtKdDE, la cual es idéntica en todas las secuencias, excepto en AAY54113 (*Parkinsonia acuelata*), AAY54108 (*Peltophorum pterocarpum*), AAY54084 (*Pterogyne nitens*), AAY54105 (*Schizolobium parahyba*) las cuales poseen una sustitución (GxDfTkdDE), sin embargo en todas las secuencias el residuo activo (K) es invariante.

7.4 Inferencias filogenéticas de Fosfoenol piruvato carboxilasa oxidasa (PEPC)

7.4.1 Generalidades de la enzima

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en todos los organismos fotosintéticos como plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas, pero también en bacterias no fotosintéticas y protozoos. En plantas se han encontrado isoformas tanto en tejido fotosintético como no fotosintéticos; su función en el proceso fotosintético (ver figura 25) parece ser participar en el reemplazo de los ácidos del ciclo de Krebs que se utilizan en reacciones sintéticas y formar el malato necesario en los procesos de balanceo de carga (Salisbury y Ross, 1982); simultáneamente, en las formas no fotosintéticas se le ha involucrado en procesos como la formación y germinación de la semilla, maduración del fruto, además que al parecer tiene un rol especializado en las células guarda durante la apertura estomática (Chollet *et al.*, 1996) por lo tanto es una enzima con menor grado de conservación a diferencia de rubisco (figura 2). Los genes que codifican las isoformas de PEPC se han agrupado en pequeñas familias, por ejemplo, en plantas de sorgo se han caracterizado al menos tres genes nucleares (Sv C₃, Sv C₃l y Sv C₄) que codifican una forma relacionada con el metabolismo C₃, otra que se expresa específicamente en raíz y una más involucrada en el metabolismo C₄; por otro lado, la familia de genes que codifican PEPC en maíz está integrado al menos por 5 genes clasificados en tres grupos con base en sus patrones de expresión, el gen PEP-C₄, el involucrado en el metabolismo C₄, está localizado cerca del centrómero del cromosoma 9, mientras que otros genes de esta familia se localizan en los cromosomas 4L, 5 y 7 (Chollet *et al.*, 1996). En otros grupos como *Flaveria*, *Arabidopsis*, *Maiz*, *Saccharum*, *Glycine* existen pequeñas familias de genes constituidos al menos por 3 PEP-C distintas (Chollet *et al.*, 1996; Besnard *et al.*, 2002; Sánchez y Cejudo, 2003). La PEP-C esta compuesta de 4 subunidades su masa y cantidad de aminoácidos varía dependiendo del tipo de organismo: 870 (100 KDa), 970 (110 KDa), 1100 (116 KDa) y 1150 (134 KDa) para bacterias, plantas vasculares, cianobacteria y protozoos respectivamente. Cabe mencionar que hasta el 2004 no existían secuencias disponibles de PEP-C de Archeobacterias. El alineamiento de las secuencias disponibles han evidenciado que el dominio C terminal esta altamente conservado y que algunas diferencias en la longitud de las subunidades puede deberse a la adición o inserción de secuencias extra en su región amino terminal (Katsura *et al.* 2004).

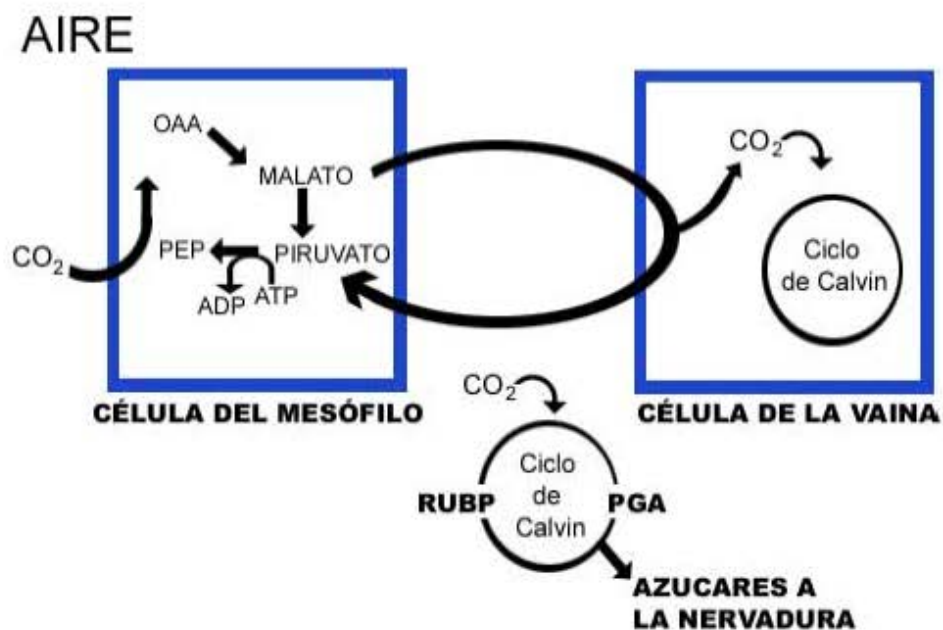


Figura 25 Función fotosintética de la PEP-C

7.4.2 Análisis de las isoformas PEP-C en la fotosíntesis en especies C_3 , C_4 y C_3 - C_4 del género *Flaveria*.

Engelmann *et al.*, 2003 realizó un análisis funcional y genético de las isoformas de PEPC en miembros del género *Flaveria* incluyendo especies C_3 , C_4 e intermedias para establecer la evolución molecular de las isoformas PEPC 4 y para identificar las regiones de la enzima que determinan las características cinéticas y regulatorias. Reportaron que los niveles de expresión de isoformas C_4 son muy bajos en las especies con metabolismo C_3 , que se incrementan levemente en las especies de metabolismo intermedio y que los niveles de expresión aumentan considerablemente en las C_4 . Mostraron que entre las secuencias C_3 , C_4 e intermedias existen al menos 59 sustituciones; 8 sustituciones que diferencian a las isoformas C_3 de las C_3 - C_4 ; 15 a las similares a C_4 de las C_3 y 40 a las C_4 de las C_3 , por otra parte entre C_3 - C_4 existen al menos 10 sustituciones y 47 entre las C_3 - C_4 y las C_4 , finalmente existen 49 sustituciones entre las similares a C_4 y las C_4 (Cuadro 3). Asimismo determinaron que 11 residuos funcionalmente importantes se encuentran conservados en los cuatro tipos de isoformas (cuadro 4) por lo que realizamos un alineamiento con todas las secuencias analizadas en este trabajo observando que esos residuos están conservados en todas, lo cual sugiere que sustituciones no sinónimas en estos sitios habrían estado sujetos a la acción purificadora de la selección. Cabe mencionar que en el

extremo N todas las secuencias, excepto las formas bacterianas y una de *Zea mays*, presentan Serina en la posición 11 (aproximadamente), ese residuo ha sido involucrado en la fosforilación reversible por parte de la PEP-Cinasa (Sánchez y Cejudo 2003) y al cual se le ha involucrado en la disminución de la sensibilidad al malato y en el incremento de la actividad (Nakagawa, *et al.*, 2003).

	C ₃	C ₃ -C ₄	C ₄ like
C ₃ -C ₄	8		
C ₄ Like	15	10	
C ₄	40	47	49

Cuadro 3 Sustituciones en las PEP-C de especies C₃, C₄ e intermedias del género *Flaveria*. elaborado con información de Engelmann *et al.*, 2003.

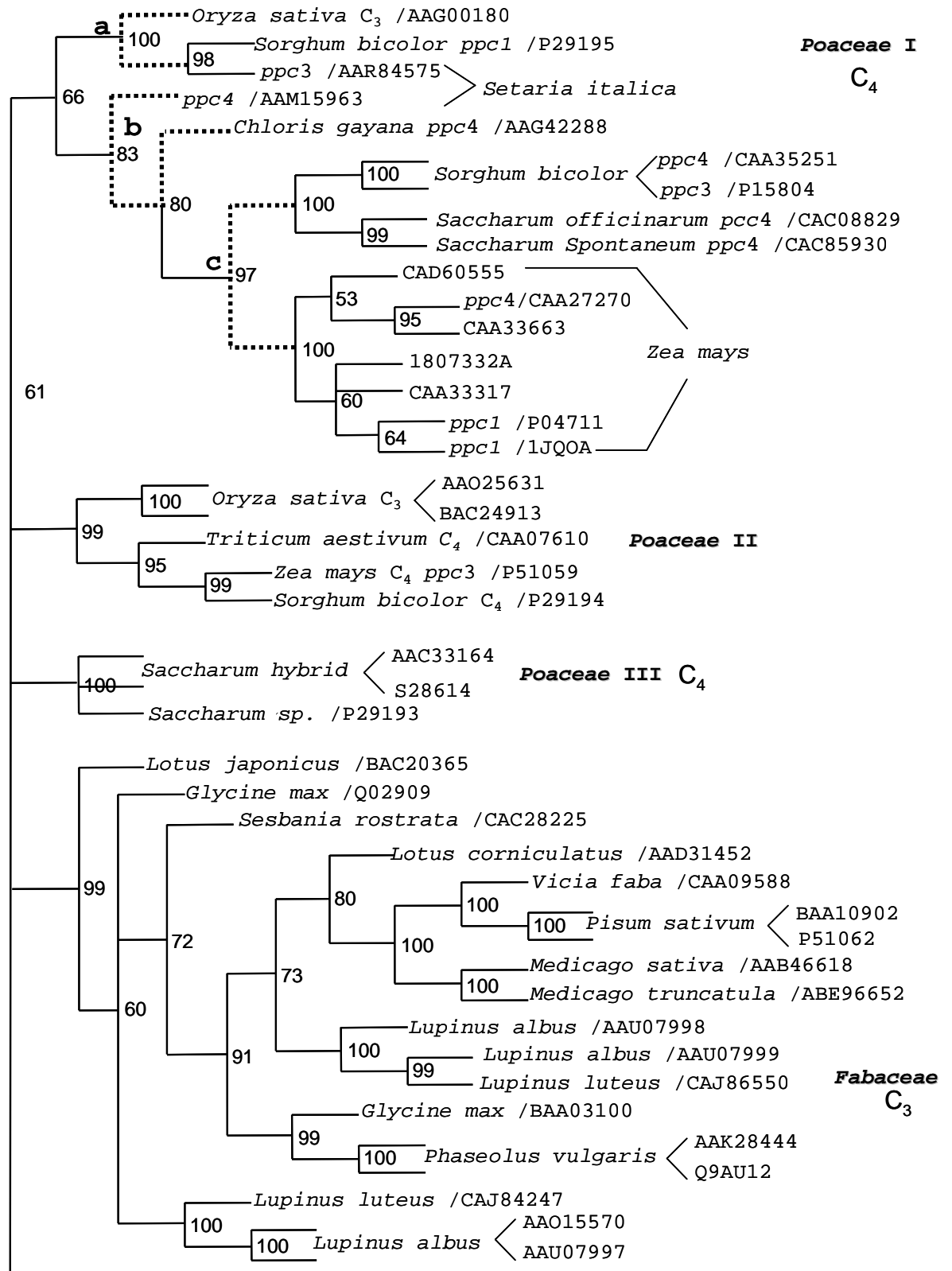
Las ppc4 se distinguen de las ppc3 por sus propiedades cinéticas, las plantas C₃ poseen una mayor afinidad por el CO₂ (Km) que las plantas C₄. Engelmann *et al.*, 2003 encontraron 2 regiones involucradas en la saturación cinética de la enzima, una de ellas es el residuo S/A encontrado en la posición 774. El residuo Serina es característico de las ppc4 del género *Flaveria*, de las familias *Amarantaceae* y *Poaceae*; mientras que Alanina es característico de las plantas C₃ así como isoformas PEP-C no fotosintéticas que se encuentran en varias vías del metabolismo básico de las plantas, así como en las PEP-C de plantas CAM. La Alanina en esa posición también se encuentra en plantas con metabolismo C₃-C₄ como en el género *flaveria* y *A. tenella*. Engelmann *et al.*, 2003 afirma que el cambio de Alanina a Serina es una variación determinante en la evolución de las ppc3 a ppc4. Sin embargo esa regla no se aplica en las las secuencias utilizadas en nuestro estudio debido a que la secuencia AAB46618 (*M. sativa*) presenta Prolina en esta posición, mientras que una isoforma 4 de *Amarantaceae* presenta al residuo Alanina en esta posición.

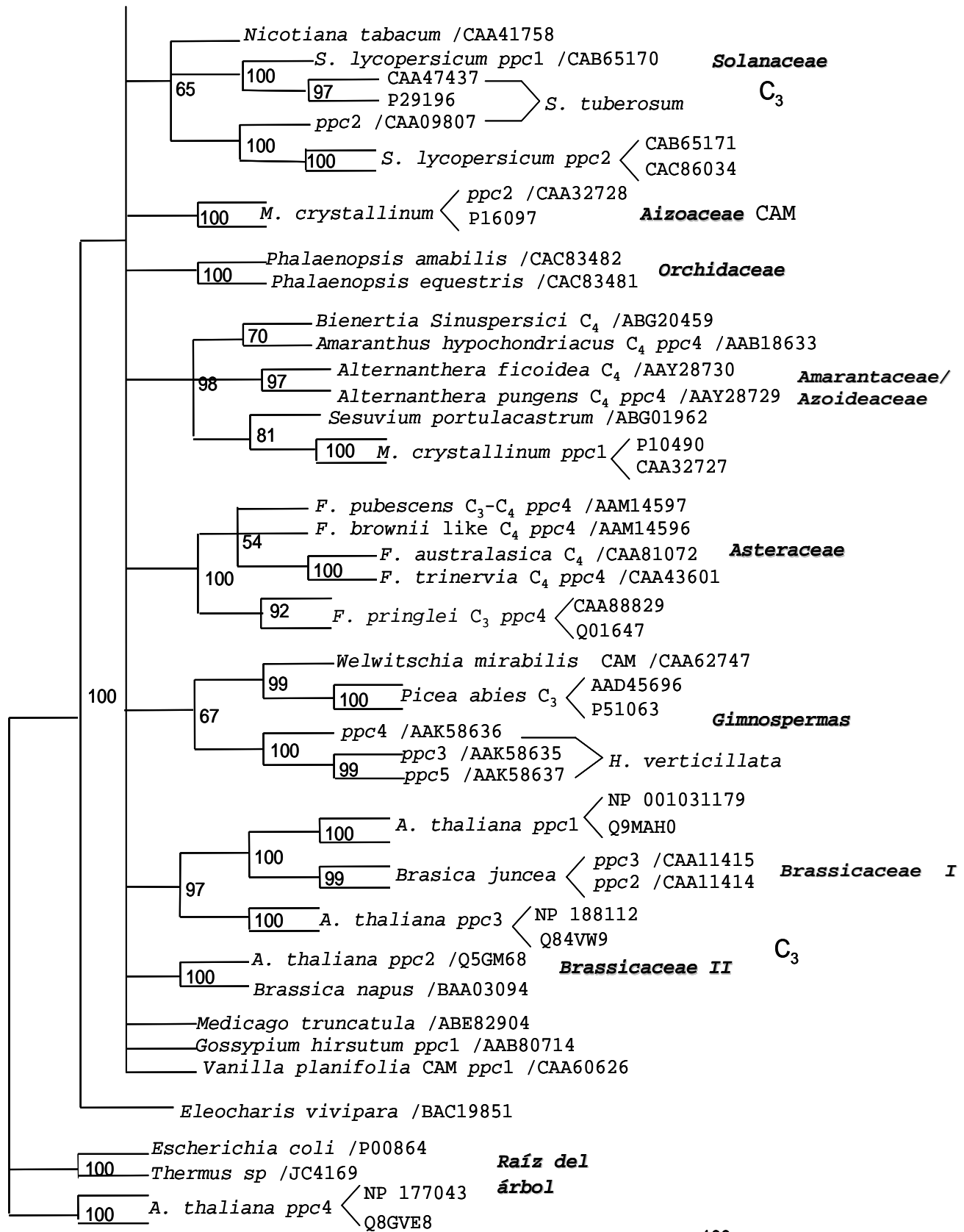
		Función									
		Unión a PEP			Unión a Mg 2		Unión a Aspartato				
Posición	Fosforilación	283	558	592	560	597	641	829	888	964	774
Aminoácido	S	W	L	M	E	D	R	K	R	N	S/A

Cuadro 4 Residuos importantes en las PEP-C de algunos miembros del género *Flaveria*. Elaborado con información de Engelmann *et al.*, 2003.

En la figura 26 se presenta el árbol filogenético obtenido utilizando el modelo de máxima parsimonia con las secuencias de aminoácidos de la enzima PEP-C de plantas y bacterias disponibles en el banco de información genética (www.ncbi.com del National Center for Biotechnology Information), contiene 81 secuencias con aproximadamente 1113 residuos mostrando 859 sitios conservados y 246 sitios variables, estas secuencias analizadas corresponden a especies vegetales que presentan metabolismo C₃, C₄ e incluso CAM; los números de acceso de las secuencias se presentan en los nodos terminales y se enlistan en el apéndice II. El valor numérico anotado en las ramas intermedias corresponde con resultado del análisis de bootstrap. En este análisis se incluyeron isoformas diferencialmente expresadas en tallo, hoja, raíz, nódulo, fruto y semilla en algunas plantas. La estructura del árbol sugiere una evolución de tipo radial con al menos a 12 grupos bien definidos apoyados con valores bootstrap superiores 65%. La estructura del árbol parece sugerir que el origen de las distintas isoformas se ha dado mediante duplicación de formas ancestrales y posterior divergencia; eventualmente esas formas modificadas podrían haber favorecido la aparición independiente de tipos metabólicos C₄ o CAM, tal como lo ha sugerido para el género *Flaveria* (Gowik *et al.*, 2004; Westhoff y Gowik, 2004) para otros grupos (Cushman y Borland, 2002). El análisis de estos resultados parecen sugerir que la inclusión de distintas isoformas no permiten inferir la historia evolutiva de grupos diversos, dado que esas isoformas han tenido origen independiente, por otro lado todavía no se han caracterizado los homólogos dentro de muchos grupos lo cual permitiría establecer la historia de formas específicas dentro de grupos íntimamente relacionados. En algunos casos cuando se dispone de esa información el análisis filogenético con secuencias homólogas ha permitido hacer inferencias evolutivas como los realizados por Besnard *et al.*, 2002 quienes amplificaron isoformas C₄ de miembros de la familia *Poacea*, estableciendo que algunas subfamilias se caracterizan por la presencia de indel en la región intermedia del gen (Besnard *et al.*, 2002).

Figura 26 Árbol filogenético elaborado con secuencias de aminoácidos la PEP-C de especies de plantas con distinto tipo metabólico utilizando el modelo de máxima parsimonia, los números en las ramas intermedias indican los valores de bootstrap; el árbol fue enraizado con secuencias de *E. coli* y *Thermus sp.*





7.4.3 Análisis de los cladogramas

7.4.3.1 Clado *Poaceae* I

En el árbol se observan al menos 12 cladogramas, algunos constituidos por especies de una misma familia (como los *Poaceae* I y II, los cuales agrupan isoformas de *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays*) independientemente de que pertenezcan a especies con metabolismo C₃ o C₄. En el Clado *Poaceae* I seis isoformas han sido caracterizadas como isoformas C₄, cinco secuencias, a pesar de que han sido amplificadas de especies con metabolismo C₄, no se ha establecido si poseen los patrones de expresión propios de isoformas C₄. El clado *Poaceae* I forma 2 grupos con bootstrap de 66, el primero presenta a las isoformas de *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* y *Setaria italica* (Yamamoto *et al.*, 2000; Cretin *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 2003) las cuales presentan una distancia genética de 0.043 (cuadro 5), el alineamiento de estas secuencias muestra 67 sitios variables (figura 26). El segundo agrupa a un total de trece isoformas, seis de las cuales están involucradas en el metabolismo C₄ en *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Chloris gayana*, *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum* (Besnard *et al.*, 2002) y la secuencia AAM15963 que ha sido reportado como un pseudogen de *Setaria italica* (Ding *et al.*, 2003), por su parte la secuencia P15804 de *S. bicolor* corresponde con una isoforma 3 (Cretin *et al.*, 1990), mientras que cuatro secuencias de *Zea mays* se desconoce la isoforma a la que pertenecen. El alineamiento de las secuencias de este grupo muestra 227 sitios variables de un total de 971 aminoácidos (figura 27), el número de sitios variables aunado al valor de bootstrap sugiere que las isoformas de *Zea mays* también codifican isoformas del tipo 4. Para apoyar esa hipótesis, se realizó un alineamiento de las secuencias de *Zea mays* encontrando solo 14 sitios variables (figura 27) sin embargo y contrario a nuestra suposición, Westhoff y Gowik, 2004 afirman que las isoformas pepc3 se expresan en bajos niveles en plantas C₄, mientras que la isoforma pep-c4 es altamente expresada en hojas, específicamente en las células del mesófilo, por lo que solamente el análisis de los patrones de expresión de una isoforma específica nos permitirá establecer la si corresponde con formas 3 o 4.

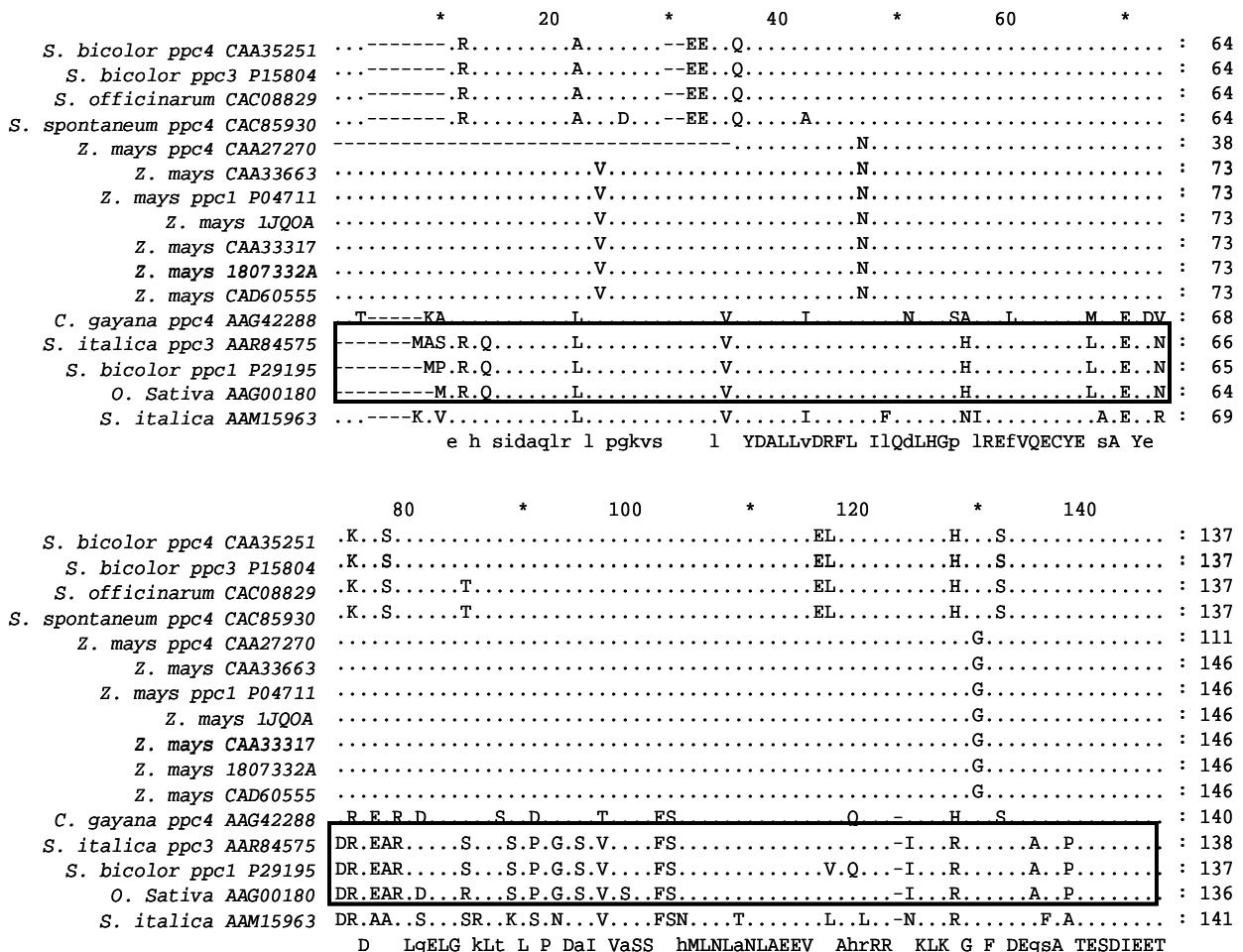
Cuadro 5 Distancias genéticas del Clado *Poaceae* I

	Dentro del grupo	Entre grupos	
Gp a	0.043	a	B
Gp b	0.181	b	0.182
Gp c	0.050	c	0.188 0.168

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 921 sitios de las 16 secuencias distribuidas en: grupo a, 3 secuencias; grupo b, 2 secuencias y grupo c, 11 secuencias.

Por otro lado, el grupo a y c de este clado son grupos compactos (distancia p 0.43 y 0.50 respectivamente) mientras que el grupo b, integrado por las secuencias de *Setaria itálica* y *Chlorys gayana*, es un grupo más bien laxo (distancia p de 0.181), cuando se calcula la distancia genética entre grupos se observa que la distancia evolutiva que separa al grupo a y b es mayor que la que separa al c y b. Con estas observaciones y atendiendo en el grupo b se encuentra un pseudogen junto con una forma C₄ podemos sugerir que el pseudogen pudo evolucionar de una forma C₃ primitiva, probablemente al ser liberado de las presiones selectivas, y acumuló variaciones que pudieron originar a la forma C₄ activa de *Chlorys gayana*, es posible que las 11 secuencias del grupo c pudieran evolucionar a partir de una forma intermedia que se originó de las del grupo a (la cual probablemente no ha sido caracterizada a la fecha).

Figura 27 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del clado *Poaceae* I, los puntos indican posiciones idénticas en las secuencias, en la parte inferior se muestra la secuencia consenso, la caja resalta las secuencias del grupo a.




```

*          160          *          180          *          200          *          22
S. bicolor ppc4 CAA35251 .....-..T.A.....S.....S...V.VE..K.....H. : 209
S. bicolor ppc3 P15804 .....-..T.A.....S.....S...V.VE..K.....H. : 209
S. officinarum CAC08829 .....-..T.....S.....ST..V.VE..K..... : 209
S. spontaneum ppc4 CAC85930 .....-..T.....S.....S...V.E..K..... : 209
Z. mays ppc4 CAA27270 .....V..... : 184
Z. mays CAA33663 .....V..... : 219
Z. mays ppc1 P04711 .....V..... : 219
Z. mays 1JQOA .....V..... : 219
Z. mays CAA33317 .....V..... : 219
Z. mays 1807332A .....V..... : 219
Z. mays CAD60555 .....V..... : 219
C. gayana ppc4 AAG42288 .....I...Q...D.....E..L.....L.....HTK.....Y.....E.E.K.....A : 213
S. italica ppc3 AAR84575 .....Q...R...D.....PV.....HG.....R..Y...A..... : 211
S. bicolor ppc1 P29195 .....Q...R...D.....V.....HG.....R..Y...A..... : 210
O. Sativa AAG00180 .....TQ...R...D.....V.....HG.....R..Y...A..... : 209
S. italica AAM15963 .....T...K...D.....V.....H.....Y...N.E..... : 214
LKRLV s GK eEVF ALKNQ VdLVfTAHTPQs RRSL LQK rIRNCLtQL aKD T dK ELDEALqr

```

```

0          *          240          *          260          *          280          *
S. bicolor ppc4 CAA35251 .....N.....D...K.C..... : 282
S. bicolor ppc3 P15804 .....N.....D...K.C..... : 282
S. officinarum CAC08829 .....Q.....K.C..... : 282
S. spontaneum ppc4 CAC85930 .....K.C..... : 282
Z. mays ppc4 CAA27270 .....S..... : 257
Z. mays CAA33663 .....S..... : 292
Z. mays ppc1 P04711 .....A.....S..... : 292
Z. mays 1JQOA .....A.....S..... : 292
Z. mays CAA33317 .....S..... : 292
Z. mays 1807332A .....S..... : 292
Z. mays CAD60555 .....S..... : 292
C. gayana ppc4 AAG42288 .....S.....F.....I.....S.....DA V K : 286
S. italica ppc3 AAR84575 .....TP.....A...F...I.....I.....A...Q..... : 284
S. bicolor ppc1 P29195 .....TP.....A...F...I.....I.....A...Q..... : 283
O. Sativa AAG00180 .....TP.....A...F...I.....I.....A...Q..... : 282
S. italica AAM15963 .....C.....F...I.....D.....A...Q..... : 287
EIQAaFRtDEIRR qPTPQdEMrYgMSY HET WkGVPKFLRRvDTALKnIGInerLPYn lI F SWMGGD

```

```

300          *          320          *          340          *          360
S. bicolor ppc4 CAA35251 .....S.....N.V.....A...VQ.TPA..... : 355
S. bicolor ppc3 P15804 .....S.....N.V.....A...VQ.TPA..... : 355
S. officinarum CAC08829 .....S.....V.....A...VQ.TPA..... : 355
S. spontaneum ppc4 CAC85930 .....S.....V.....A...VQ.TPA..... : 355
Z. mays ppc4 CAA27270 .....E.....DV..... : 329
Z. mays CAA33663 .....E..... : 364
Z. mays ppc1 P04711 .....E..... : 364
Z. mays 1JQOA .....E..... : 364
Z. mays CAA33317 .....E..... : 364
Z. mays 1807332A .....E..... : 364
Z. mays CAD60555 .....E..... : 364
C. gayana ppc4 AAG42288 .....VSS.....A D HLA RET --- H RA : 356
S. italica ppc3 AAR84575 .....FS.....S...I..D..RR.--.RAA.H..... : 355
S. bicolor ppc1 P29195 .....FS.....S...I..D..R.--.RAA.H..... : 354
O. Sativa AAG00180 .....FS.....S...I..DD..C.--.RAA.H..... : 353
S. italica AAM15963 .....S...FSR..E.....A.....A.--.QRIS.H.....R : 358
RDGNPRVTPEVTRDVCLL RMMAaNLy q E LMFELSMWRcNDeLR RA e sk K YIEFWkq

```

	*	380	*	400	*	420	*	4	
<i>S. bicolor ppc4</i> CAA35251	A.....	T.F.....	EDAV.K.....	E.....				: 428
<i>S. bicolor ppc3</i> P15804	A.....	T.F.....	EDAV.K.....	E.....				: 428
<i>S. officinarum</i> CAC08829	A.....	T.F.....	VD.V.N.....					: 428
<i>S. spontaneum ppc4</i> CAC85930	A.....	T.F.D.....	VD.V.N.....					: 428
<i>Z. mays ppc4</i> CAA27270								: 402
<i>Z. mays</i> CAA33663								: 437
<i>Z. mays ppc1</i> P04711								: 437
<i>Z. mays</i> 1JQOA								: 437
<i>Z. mays</i> CAA33317								: 437
<i>Z. mays</i> 1807332A								: 437
<i>Z. mays</i> CAD60555								: 437
<i>C. gayana ppc4</i> AAG42288	ES.....	L.Y.....	L.M.TK.Y.....	KE.ATI.V.....	M.V.....	T.L.....			: 429
<i>S. italica ppc3</i> AAR84575	V.....	D.....	Y.....	S.....	TT.I.....	PE.AT.NV.Q.....	R.A.....	P.....	: 428
<i>S. bicolor ppc1</i> P29195	V.....	D.....	Y.....	S.....	S.I.....	PE.AT.NV.Q.....	R.A.....	P.....	: 427
<i>O. Sativa</i> AAG00180	G.....	Y.....	T.....	TT.....	PE.AT.NV.....	R.A.....	P.....	: 426
<i>S. italica</i> AAM15963	L.A.....	V.Y.....	E.S.....	S.....	T.F.D.PED.A.KNV.....			T.....	: 431

iPpnEPYRViLG VRdkLY TRER rHLl G SeI ft EeFlEPLelCYkSLC CGDK IADGsLL

	40	*	460	*	480	*	500	*		
<i>S. bicolor ppc4</i> CAA35251		Q.....		S.....	M.V.K.....	M.....		: 501	
<i>S. bicolor ppc3</i> P15804		Q.....		S.....	M.V.K.....	M.....		: 501	
<i>S. officinarum</i> CAC08829			Y.....	S.....	M.V.K.....	M.....		: 501	
<i>S. spontaneum ppc4</i> CAC85930			Y.....	S.....	M.V.K.....	M.....		: 501	
<i>Z. mays ppc4</i> CAA27270				S.....		D.....		: 475	
<i>Z. mays</i> CAA33663				S.....				: 510	
<i>Z. mays ppc1</i> P04711						D.....		: 510	
<i>Z. mays</i> 1JQOA						D.....		: 510	
<i>Z. mays</i> CAA33317						D.....		: 510	
<i>Z. mays</i> 1807332A						D.....		: 510	
<i>Z. mays</i> CAD60555				S.....				: 510	
<i>C. gayana ppc4</i> AAG42288	FM.....	N.....	A.....	AV.....	K.....	E.....	O.....	V.....	V.....	: 502
<i>S. italica ppc3</i> AAR84575	F.....	S.....	A.....	D.....	L.S.K.....	A.S.E.D.....	S.....	FGS.....	L.....	: 501
<i>S. bicolor ppc1</i> P29195	F.....	N.....	A.....	D.....	L.S.....	A.S.E.D.....		FGS.....		: 500
<i>O. Sativa</i> AAG00180	F.....	S.....	A.....	D.....	L.....	Y.....	A.S.E.D.....	FG.....		: 499
<i>S. italica</i> AAM15963	FM.....	S.....	M.....				S.E.....	SK.M.....		: 504

D lRQV tFGLslvKLDIRQESerhTDv DaITthLGIGSY W E KR eWL SEL GKRPLl pDlP T E

	520	*	540	*	560	*	580	
<i>S. bicolor ppc4</i> CAA35251	MR.....	I.....	C.....	I.T.....	A.....	K.....	: 574
<i>S. bicolor ppc3</i> P15804	MR.....	I.....	C.....	I.T.....	A.....	K.....	: 574
<i>S. officinarum</i> CAC08829	M.....	S.....	C.....	I.T.....	A.....		: 574
<i>S. spontaneum ppc4</i> CAC85930	M.....	S.....	C.....	I.T.....	A.....		: 574
<i>Z. mays ppc4</i> CAA27270				PAV.....	S.LR.....		: 548
<i>Z. mays</i> CAA33663				PAV.....	S.....		: 583
<i>Z. mays ppc1</i> P04711							: 583
<i>Z. mays</i> 1JQOA							: 583
<i>Z. mays</i> CAA33317							: 583
<i>Z. mays</i> 1807332A							: 583
<i>Z. mays</i> CAD60555							: 583
<i>C. gayana ppc4</i> AAG42288	VEA.....	L.C.K.....	R.....			N.....		: 575
<i>S. italica ppc3</i> AAR84575	T.....	L.....	A.C.A.V.....		H.KH.R.....	K.....	K.A.A.....	: 574
<i>S. bicolor ppc1</i> P29195	T.....	L.T.....	A.C.A.....		H.K.R.....	K.....	EA.A.A.....	: 573
<i>O. Sativa</i> AAG00180	L.T.....	A.C.A.....		H.K.....	R.....	K.EA.A.A.....	: 572
<i>S. italica</i> AAM15963	L.C.....	R.....		H.K.....	K.....	I.....	: 577

iadV G hVLAELP DsFGpYIiSM TAPSDVLAVELLQREC q lpVVPLFE lAdLq aPAsverLFS

	*	600	*	620	*	640	*	
<i>S. bicolor</i> ppc4 CAA35251	T	..INH.N	V	K	: 647
<i>S. bicolor</i> ppc3 P15804	T	..INH.N	V	K	: 647
<i>S. officinarum</i> CAC08829	T	..F.H	V	K	: 647
<i>S. spontaneum</i> ppc4 CAC85930	T	..F.H	V	K	: 647
<i>Z. mays</i> ppc4 CAA27270			Q	: 621
<i>Z. mays</i> CAA33663			Q	: 656
<i>Z. mays</i> ppc1 P04711			Q	: 656
<i>Z. mays</i> 1JQOA			Q	: 656
<i>Z. mays</i> CAA33317			Q	: 656
<i>Z. mays</i> 1807332A			Q	: 656
<i>Z. mays</i> CAD60555			Q	: 656
<i>C. gayana</i> ppc4 AAG42288	T	..I.N.G.T	O	..L.V.O	..K.D.V.F	: 648
<i>S. italica</i> ppc3 AAR84575	IN..E..I	M.K	..LI..Q	..M	: 647
<i>S. bicolor</i> ppc1 P29195	IN..N..E..I	M.K	..LI..H	..M	: 646
<i>O. Sativa</i> AAG00180	IN..N..E..I	M.K	..LV..H	..MS	: 645
<i>S. italica</i> AAM15963	LN..G	H.K	..A	..M	: 650

DWY I GKQqvMvGYSDSGKDAGRLSAAWqly AQEe a VAK YgVK1T FHGRGGTVGRGGGpTHLAI

	660	*	680	*	700	*	720	*	
<i>S. bicolor</i> ppc4 CAA35251			..M..N	..SE	: 720
<i>S. bicolor</i> ppc3 P15804			..M..N	..SE	: 720
<i>S. officinarum</i> CAC08829			..M..D	..SE	: 720
<i>S. spontaneum</i> ppc4 CAC85930			..M..D	..SE	: 720
<i>Z. mays</i> ppc4 CAA27270				..S	: 694
<i>Z. mays</i> CAA33663					: 729
<i>Z. mays</i> ppc1 P04711					: 729
<i>Z. mays</i> 1JQOA					: 729
<i>Z. mays</i> CAA33317					: 729
<i>Z. mays</i> 1807332A					: 729
<i>Z. mays</i> CAD60555					: 729
<i>C. gayana</i> ppc4 AAG42288		..E	..T	..T	..H.S	..R	..T	..D.A	: 721
<i>S. italica</i> ppc3 AAR84575		..H..LH.S	..R	..YI.....A.....I..K	: 720
<i>S. bicolor</i> ppc1 P29195		..H..LH.S	..L..R	..YI.....A.....K	: 719
<i>O. Sativa</i> AAG00180		..H..LH.S	..RI.....A.....K	: 718
<i>S. italica</i> AAM15963		..LT.SRA.....I.A...D	: 723

LSQPpDtInGS RVTvQGEVIE FGEehLcF LQRfTAATLEHGMHPP SPKPEWR LM EmAvVAT eYR

	740	*	760	*	780	*	800	
<i>S. bicolor</i> ppc4 CAA35251		KW	: 793
<i>S. bicolor</i> ppc3 P15804		KW	: 793
<i>S. officinarum</i> CAC08829		KKW	: 793
<i>S. spontaneum</i> ppc4 CAC85930		KKW	: 793
<i>Z. mays</i> ppc4 CAA27270		A	: 767
<i>Z. mays</i> CAA33663		A	: 802
<i>Z. mays</i> ppc1 P04711		A	: 802
<i>Z. mays</i> 1JQOA		A	: 802
<i>Z. mays</i> CAA33317		A	: 802
<i>Z. mays</i> 1807332A		A	: 802
<i>Z. mays</i> CAD60555		A	: 802
<i>C. gayana</i> ppc4 AAG42288						S S	: 794
<i>S. italica</i> ppc3 AAR84575		..I.FQS..K.S	..ESS.A.....F....HLM	: 793
<i>S. bicolor</i> ppc1 P29195		..I.FQS..K.S	..ESA.....F...I.HIM	: 792
<i>O. Sativa</i> AAG00180		..I.FS..K.S	..ESA.....F.G...HIM	: 791
<i>S. italica</i> AAM15963		..MRLK.K	..ES.....F...EH.M	: 796

SvV kE RFVEYFRSATPETEYg mNIGSRPaKR P GGI LRAIPWifSwtQTRFHLpVWLg GaAfk a

```

*      820      *      840      *      860      *
S. bicolor ppc4 CAA35251 .....K...K..... : 866
S. bicolor ppc3 P15804 .....K...K..... : 866
S. officinarum CAC08829 .....K...K.....L...DD.....EK..... : 866
S. spontaneum ppc4 CAC85930 .....K...K.....L...DD.....M...EK..... : 866
Z. mays ppc4 CAA27270 .....V..... : 840
Z. mays CAA33663 .....V..... : 875
Z. mays ppc1 P04711 .....V..... : 875
Z. mays 1JQOA .....V..... : 875
Z. mays CAA33317 .....V..... : 875
Z. mays 1807332A .....V..... : 875
Z. mays CAD60555 .....V..... : 875
C. gayana ppc4 AAG42288 .....K...L...D...R.....A...K...TD...E...S...A...E..... : 867
S. italica ppc3 AAR84575 Q.....IHT.....AV...K...D...QS...E...KN...E...KE...V..... : 866
S. bicolor ppc1 P29195 Q.....IH.....AV...K...D...QS...E...KN...E...KE...V..... : 865
O. Sativa AAG00180 Q.....IHT.....A...K...GD...QS...E...NNFE...K...V..... : 864
S. italica AAM15963 K...K...RM.....L.....T.....Q...D...E...NN...EK...I...V..... : 869
KD Nf LKeMYnEWPFFRVTLDLLEMVfAKGDPgIA lYD LLVa LkpFG QLR y ET LllQ A

```

```

880      *      900      *      920      *      940
S. bicolor ppc4 CAA35251 .....S.....-GERV. : 938
S. bicolor ppc3 P15804 .....S.....-GERV. : 938
S. officinarum CAC08829 .....L.....C..... : 939
S. spontaneum ppc4 CAC85930 .....L.....S..... : 939
Z. mays ppc4 CAA27270 .....F...V..... : 913
Z. mays CAA33663 .....F...V..... : 948
Z. mays ppc1 P04711 .....F...V..... : 948
Z. mays 1JQOA .....F...V..... : 948
Z. mays CAA33317 .....F...V..... : 948
Z. mays 1807332A .....F...V..... : 948
Z. mays CAD60555 .....F...V..... : 948
C. gayana ppc4 AAG42288 .....E...A...R...D.....O...KT...N...OD-----A : 933
S. italica ppc3 AAR84575 .....V.....R...ES.....C.....G...Q...S...A...T...SQ...Q...Q...E...A : 939
S. bicolor ppc1 P29195 .....V.....R...ES.....C.....S...Q...S...T...SQ...VE...Q...QQ...A : 938
O. Sativa AAG00180 .....R...ES.....C.....S...E...MS...A...V...S...Q...E...Q...A...A : 937
S. italica AAM15963 .....E...S...G...Q...D...I...W.....Q...R...I.....G : 942
GHKdiLEgDP LKQ L LR pYITtLNV QAYTLKIrIRDP FkV pQPpLsKEf den pa lVklN sey

```

```

*      960      *
S. bicolor ppc4 CAA35251 ..... : 960
S. bicolor ppc3 P15804 ..... : 960
S. officinarum CAC08829 ..... : 961
S. spontaneum ppc4 CAC85930 ..... : 961
Z. mays ppc4 CAA27270 .....R..... : 935
Z. mays CAA33663 ..... : 970
Z. mays ppc1 P04711 ..... : 970
Z. mays 1JQOA ..... : 970
Z. mays CAA33317 ..... : 970
Z. mays 1807332A ..... : 970
Z. mays CAD60555 ..... : 970
C. gayana ppc4 AAG42288 .....I..... : 955
S. italica ppc3 AAR84575 ..... : 961
S. bicolor ppc1 P29195 ..... : 960
O. Sativa AAG00180 ..... : 959
S. italica AAM15963 ..... : 964
PGLIEDTLlITMKGIaAGMQNTG

```

7.4.3.2 Clado *Poaceae* II

El clado *Poaceae* II apoyado con bootstrap de 99 presenta 2 grupos, el primero posee dos isoformas amplificadas y caracterizadas de hojas de *Oryza sativa* subsp. Indica Kato (AAO25631; Lin *et al.*, 2004; BAC24913; Sasaki *et al.*, 2001) la cual posee metabolismo C₃. El alineamiento de estas secuencias presenta una distancia p de 0.023 (cuadro 6). El segundo grupo contiene isoformas de *Triticum aestivum*, *Zea mays* y *Sorghum bicolor* (CAA07610, Cejudo 1998; P51059, Kawamura *et al.*, 1992; P29194, Lepiniec *et al.*, 1991) el árbol sugiere que la isoforma de *T. aestivum* se derivó de una forma ancestral que también originó las isoformas *zea* y *sorghum* solo que su origen es más antiguo dado que ha acumulado mayor cantidad de diferencias. La secuencia de PEPC de *Zea mays* incluida en este grupo corresponde con una forma C₃ (Kawamura *et al.*, 1992), su presencia en este clado sugiere que las otras isoformas de este grupo posiblemente también sean C₃, esta consideración se apoya en el hecho que la distancia p intragrupal es de 0.072. Resulta interesante hacer notar que tanto en el clado I como en el II se incluyen secuencias de *Zea mays*, como se discutió en el párrafo anterior los parálogos incluidos en el clado I corresponden con isoformas C₄ mientras que los del II son C₃; el cálculo de la distancia p entre estos dos grupos arroja un valor de 0.206 el cual triplica la distancia entre los grupos del clado II lo cual nos sugiere que la duplicación que permitió la evolución de estas formas es más antigua que la que originó las formas C₃ incluidas en el clado II. Kawamura *et al.*, 1982 sugiere que las isoformas C₄ de maíz se originaron directamente de las C₃; sin embargo la estructura de este árbol sugiere que el ancestro común entre estas secuencias es todavía más antiguo que la diversificación de la familia *Poaceae*. Cabe mencionar que las secuencias agrupadas en el clado *Poaceae* II poseen firmas PPCI y PPCII idénticas (figura 28) los cuales difieren de sus correspondientes parálogos de *zea* y *sorghum* (clado I) en una sustitución en la firma PPCI (Leucina x Fenilalanina) y otra en la firma PPCII (Isolecina X Valina).

Cuadro 6 Distancias genéticas de *Poaceae* II

Dentro del grupo		Entre grupos	
Gp 1	0.023	1	
Gp 2	0.072	2	0.07

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 966 sitios de 5 secuencias distribuidas en: grupo 1, 3 secuencias y el grupo 2, 2 secuencias.

Figura 28 Firmas PPCI y PPCII de los clados *Poaceae* I y II

	PPCI	PPCII
	180	* 600
Poaceae I	<i>Sorghum bicolor</i> < CAA35251 :
	ppc3 /P15804 :
	<i>S. officinarum</i> /CAC08829 :
	<i>S. spontaneum</i> /CAC85930 :
	ppc4 CAA27270 :
	CAA33663 :
	<i>Zea mays</i> < ppc1 /P04711 :
	1JQOA :
	CAA33317 :
	1807332A :
	CAD60555 :
	<i>C. gayana</i> /AAG42288 : .L.....L..
	<i>S. italica</i> ppc3 /AAR84575 :PV..	.I.....
	<i>S. bicolor</i> ppc1 /P29195 :V..	.I.....
	<i>O. sativa</i> /AAG00180 :V..	.I.....
<i>S. italica</i> ppc4 /AAM15963 :V..	
	VfTAHPTQs RR	MvGYSDSGKDAG
	180	600 *
Poaceae II	<i>Z. mays</i> ppc3 /P51059 :
	<i>S. bicolor</i> /P29194 :
	<i>T. aestivum</i> /CAA07610 :
	<i>O. sativa</i> < AA025631 :
	BAC24913 :
	VLTAHPTQSVRR	VMIGYSDSGKDAG

7.4.3.3 Clado *Poaceae* III

El clado *Poaceae* III posee secuencias de *Saccharum* (P29193, Albert *et al.*, 1992; AAC33164, Albert *et al.*, 2003; S28614, Sasaki *et al.*, 2001) que codifican isoformas PEPC housekeeping no fotosintéticas; esta agrupación está apoyada por valores bootstrap de 100 y distancia p de 0. El árbol filogenético sugiere que este clado se originó de una forma ancestral la cual también originó las formas fotosintéticas C₃ y C₄ incluidas en los clados *Poaceae* I y II y que probablemente las formas incluidas en el clado *Poaceae* III perdieron su función en la fotosíntesis, como resultado de la acumulación de variaciones, y posteriormente adquirieron una función no fotosintética. El cuadro 7 indica que la distancia promedio entre los grupos II y III (0.125) es aproximadamente la mitad de la distancia que separa a I de II y de III (0.206, y 0.210 respectivamente).

Cuadro 7 Distancias genéticas de los clados *Poaceae* I, II y III

Dentro del grupo		Entre grupos		
Gp I	0.118		I	II
Gp II	0.064	II	0.206	
Gp III	0.000	III	0.210	0.125

Incluye 919 aminoácidos de 24 secuencias distribuidas en: grupo I, 3 secuencias; grupo II, 5 secuencias y grupo III, 16 secuencias.

7.4.3.4 Clado *Fabaceae*

El clado *Fabaceae* esta constituido por 18 secuencias que pertenecen 8 géneros y 10 especies (figura 26), interesantemente todas las secuencias pertenecen a especies leguminosas con metabolismo C₃. Este clado esta apoyado con bootstrap de 99 lo que nos indica que es un grupo de secuencias muy conservadas algunas de las cuales se expresan diferencialmente en raíz, nódulo, brote y semilla; tres genes que codifican isoformas housekeeping están separadas del resto de las secuencias, una de ellas (BAC20365 de *Lotus japonicus*; Nakagawa *et al.*, 2003) es altamente expresada en brotes y raíces; mientras que la secuencia Q02909 de *Glycine max* (Sugimoto *et al.*, 1992) fue amplificada y caracterizada a partir de semilla, la topología del árbol sugiere que éstas dos secuencias están más relacionadas entre sí que con las demás secuencias lo cual se confirma al revisar las distancias genéticas entre los grupos (cuadro 8); el banco de información genética no contiene información del órgano del cual fue amplificada la secuencia de *Sesbania rostrata* (CAC28225, Aono y Oyaizu, 2000). Finalmente, estas evidencias parecen sugerir que las isoformas expresadas en raíces, brotes y semillas, se separaron a partir de una secuencia ancestral común y que al involucrarse en funciones distintas adquirieron de nueva cuenta una limitación funcional como lo ha sugerido Nakagawa *et al.*, 2003.

Cuadro 8 Distancias genéticas de *Fabaceae*

Dentro del grupo		Entre grupos		
Gp 1	0.059		1	2
Gp 2	0.078	2	0.110	
Gp 3	0.034	3	0.091	0.079

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 949 sitios de las 18 secuencias distribuidas en: grupo 1, 3 secuencias; grupo 2, 12 secuencias y grupo 3, 3 secuencias.

Adicionalmente, en el clado *Fabaceae* se observan 2 grupos: el primero está apoyado por bootstrap de 91 y esta integrado por 12 secuencias, de las cuales 4 no presentan información respecto a la parte de la planta de la cual se amplificaron, este es el caso de BAA10902 de *Pisum sativum* (Suganuma *et al.*, 1997), ABE96652 de *Medicago truncatula* (Shaull *et al.*, 2003) y 2 de *Phaseolus vulgaris* (AAK28444 y Q9AU12 Blanco y Lara, 2000); 4 genes fueron amplificados y caracterizados de nódulo, *Lotos corniculatus* (AAD31452 Pace *et al.*, 1999), *Pisum sativum* (P51062 Suganuma *et al.*, 1997), *Medicago sativa* (AAB46618 Pathirana *et al.*, 1992), *Lupinus luteus* (CAJ86550 Kleinert *et al.*, 2006); 2 fueron amplificados de semillas de *Vicia faba* (CAA09588 Golombek *et al.*, 1999), *Glycine max* (BAA03100 Vazquez-Tello *et al.*, 1998) y 2 de raíz *Lupinus albus* (AAU07998 Peñaloza *et al.*, 2005; AAU07999 Uhde-Stone *et al.*, 2001). La distancia p intragrupal es de 0.078 lo que indica que la variabilidad del grupo es relativamente elevado, posiblemente reflejando la diversidad de procesos fisiológicos en los cuales están involucradas estas isoformas (Nakagawa *et al.*, 2003). Apoyando esta idea Peñaloza *et al.*, 2005, reporta que las secuencias de *L. albus* de este grupo se expresan en algunas raíces cuando la planta enfrenta deficiencias de fosfato. El otro grupo del clado *Fabaceae* esta apoyado por bootstrap de 100 y esta integrado por secuencias amplificadas y caracterizadas de raíz de *Lupinus luteus* (CAJ84247 Kleinert *et al.*, 2006), *L. albus* (AA015570 Uhde-Stone *et al.*, 2001) y (AAU07997 Peñaloza *et al.*, 2005) del cultivar *Victoria baer*, la cual también es altamente expresada cuando la planta presenta deficiencia de fosfato. Atendiendo a la topología del árbol se puede sugerir que la secuencia de *L. luteus* se derivó de una forma ancestral que también originó a las secuencias de *L. albus* además es importante mencionar que las secuencias de *L. albus* y *luteus* de este grupo poseen parálogos que se localizan en el otro grupo. Las secuencias de este clado presentan firmas PPCI y PPCII idénticas (Fig. 29), además es notorio que las secuencias de *lupinus albus* y *luteus* presentan una sustitución (V x I) en la firma I la cual es compartida por la secuencia de *G. max*, lo cual nos sugiere que esta secuencias también se

expresa en condiciones de deficiencia de fosfato.

Figura 29 Firmas PPCI y PPCII del clado *Fabaceae*

	PPCI	PPCII
	* 180	600
<i>Pisum sativum</i> < BAA10902 :
P51062 :
<i>Vicia faba</i> /CAA09588 :
<i>Medicago sativa</i> /AAB46618 :
<i>Medicago truncatula</i> /ABE96652 :
<i>Lotus corniculatus</i> /AAD31452 :
<i>Lupinus albus</i> < AAO15570 :I..
AAU07997 :I..
<i>Lupinus luteus</i> /CAJ84247 :I..
<i>Lotus japonicus</i> /BAC20365 :
<i>Glycine max</i> /Q02909 :
<i>Sesbania rostrata</i> /CAC28225 :
Phaseolus vulgaris < AAK28444 :
Q9AU12 :
<i>Glycine max</i> /BAA03100 :I..
<i>Lupinus albus</i> /AAU07999 :I..
<i>Lupinus luteus</i> /CAJ86550 :I..
<i>Lupinus albus</i> /AAU07998 :I..
	VLT AHPTQS RR	VMIGYSDSGKDAG

7.4.3.5 Clado *Solanaceae*

El clado *Solanaceae* agrupa secuencias de especies con metabolismo C_3 , está integrado por 7 secuencias apoyadas con bootstrap de 65, la distancia p de 0.089 y presenta 2 grupos y una secuencia de *Nicotiana tabacum* (CAA41758 Koizumi *et al.*, 1991) separada. El primero grupo de este clado contiene 2 secuencias de *Solanum tuberosum*: CAA47437 (Merkelbach *et al.*, 1993) amplificada de hoja; P29196 (Merkelbach *et al.*, 1995) y una de *Solanum lycopersicum* (CAB65170; Guillet *et al.*, 1999) amplificada del cultivar *Wva106* que codifica a la isoforma 1. Esta secuencia se derivó de un gen ancestral del que también se derivaron las de *Solanum tuberosum*. El segundo grupo esta integrado por 3 secuencias amplificadas de dos cultivares de *Solanum lycopersicum* (CAB65171 y CAC86034 Guillet *et al.*, 1999) y una de *Solanum tuberosum* (CAA09807 Smets *et al.*, 1998) amplificada del cultivar *desiree*. El árbol sugiere que la secuencia de *Solanum tuberosum* se derivó de una forma ancestral de la que también se

derivaron las secuencias de *Solanum lycopersicum* reportadas como isoformas ppc2. Al respecto vale la pena mencionar que Cushman *et al.*, 1989 caracterizaron genética y fisiológicamente genes que codifican PEP-C en *M. Crystallinum*, determinando que al menos en esa especie existen dos isoformas, la ppc1 cuyo gen está constituido por 6920 bp, interrumpido por nueve intrones cuyo transcrito se acumula cuando la planta se somete a estrés salino y codifica una proteína de 966 aminoácidos con peso molecular aproximado a 110.533 kD, la otra isoforma (ppc2) está codificada por un gen de 7416 bp, contiene también nueve intrones pero la proteína esta constituida por solamente 960 residuos y presenta un peso molecular de 109, 041 kD y la concentración de su transcrito disminuye en hojas y raíces posteriores a la inducción del estrés. Dado que la información asociada a las secuencias del clado *Solanaceae* no especifica si las secuencias identificadas como ppc1, tienen alguna relación con las isoformas ppc1 de *M. Crystallinum*, se analizó el contenido de aminoácidos y la frecuencia de secuencias específicas, los resultados se presentan en el cuadro 9 indicando que el porcentaje de los distintos residuos de ambas isoformas de *L. esculentum* son más similares a los de la forma ppc2 de *M. Crystallinum*, lo que nos permite concluir que en realidad las isoformas ppc1 y 2 de *L. esculentum* están involucradas en el metabolismo C₃ de esa especie. Sin embargo habría que probar experimentalmente si los niveles de esos transcritos se modifican al someter a esas plantas a condiciones de estrés. Conclusiones semejantes pueden ser aplicadas a los demás miembros de este clado, en el mismo cuadro se muestra que con base en el contenido de residuos y la frecuencia de secuencias específicas se forman dos grupos, suponemos que por esa razón los autores de la secuenciación identificaron a sus isoformas como ppc1 y ppc2 sin considerar que previamente se había utilizado esa nomenclatura para designar isoformas involucradas en el metabolismo CAM de *M. crystallinum*.

ISOFORMA	Ppc 1		Ppc2		Ppc2	Ppc2	Ppc1	Ppc2
ESPECIE	<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>M. crystallinum</i>	<i>M. crystallinum</i>
ACCESO	CAB65170	CAA47437	P29196	CAC86034	CAA09807	CAB65171	P10490	P16097
A	7.4	7.6	7.6	6.6	6.6	6.6	6.9	7.6
C	1.1	1.1	1.1	1.1	1.3	1.1	1.0	1.0
D	6.5	6.7	6.7	6.6	6.2	6.5	6.8	6.6
E	8.5	8.6	8.6	8.6	8.9	8.6	8.5	8.4
F	3.7	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6	3.6	3.8
G	5.6	5.5	5.5	5.2	5.5	5.2	5.3	5.8
H	2.2	2.1	2.1	2.3	2.1	2.3	2.1	2.2
I	5.3	5.3	5.3	5.5	5.5	5.5	4.9	5.2
K	5.4	5.4	5.4	5.9	5.7	5.9	6.1	5.3
L	11.9	11.7	11.7	11.7	11.8	11.7	11.5	11.7
M	2.2	2.2	2.2	2.4	2.2	2.4	3.0	2.2
N	2.3	2.4	2.4	3.1	3.0	3.1	2.3	2.5
P	5.0	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	4.7	5.0
Q	4.4	4.4	4.4	3.4	3.9	3.5	3.9	3.9
R	7.4	7.6	7.6	7.3	7.3	7.3	7.9	7.4
S	5.7	5.4	5.4	6.1	6.0	6.1	5.5	6.1
T	5.1	5.1	5.1	5.4	5.3	5.4	5.9	5.0
V	5.6	5.5	5.5	5.3	5.2	5.3	5.9	5.6
W	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.2	1.5
Y	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	3.0	3.2
ST	10.8	10.5	10.5	11.5	11.3	11.5		
AGP	17.9	18.1	18.1	16.9	17.2	16.9		
FIKMNY	22.2	22.3	22.3	23.8	23.2	23.8		
RESIDUOS	964	965	965	964	964	964	966	960
PM TEORICO (kD)	110	110	110	110	110	110	110	109

Cuadro 9 Comparación del porcentaje (%) de aminoácidos y de secuencias específicas de las secuencias de *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* y *M. Crystallinum*

7.4.3.6 Clado Azoideaceae

El clado *Azoideaceae* esta apoyado por bootstrap de 100 y contiene únicamente dos secuencias de *Mesembrianthemum crystallinum* (CAA32728 Cushman *et al.*, 1989; P16097 Cushman y Bohnert, 1989) que codifican isoformas housekeeping (ppc2) cuyos niveles de transcripción no responden al estrés salino y se expresan tanto hoja como en raíz (Cushman *et al.*, 1989). Numerosas especies muestran una transición metabólica C₃ a CAM en respuesta a varios estímulos ambientales (Ting y Rayder, 1982), en algunas plantas el metabolismo CAM se induce por estrés hídrico o salino (Ting y Hanscom, 1977) por cambios en el fotoperiodo (Brulfert *et al.*, 1982), como parte de su desarrollo normal (Sipes y Ting, 1985) o por adaptación a ambientes de bajas concentraciones de CO₂ (Ting, 1985). Cushman *et al.*, 1989 designó a las isoformas cuyas tasas transcripcionales se modificaban como respuesta a los cambios ambientales como isoformas tipo pp1 en la planta de hielo.

7.4.3.7 Clado Amarantaceae-Azoideaceae

El clado *Amarantaceae* - *Azoideaceae* (apoyado por bootstrap 98) está formado por siete secuencias de cinco géneros entre los cuales 3 presentan metabolismo C₄ y dos CAM. Contiene al menos tres grupos el primero contiene una secuencia de *Bienertia sinuspersici* (ABG20459 Lara *et al.*, 2006) y otra *Amarantus hipochondriacus* (AAB18633 Rydzik y Berry, 1996) que codifican isoformas 4, el segundo contiene dos secuencias una de *Althernantera ficoidea* (AAY28730, Gowik *et al.*, 2006) y otra *A. pungens* (AAY28729, Gowik *et al.*, 2006) que también codifican isoformas 4; el tercer grupo posee secuencias parálogas de *Mesembrianthemum crystallinum* (P10490 Rickers *et al.*, 1989 y CAA32727 Cushman *et al.*, 1989), las cuales codifican a la isoforma ppc1 expresada como respuesta al estrés salino y que al parecer posee un ancestro del que también se derivó la secuencia de *Sesivium portulacastrum* (ABG01962 Sankararamasubramanian *et al.*, 2006) también involucrada en la respuesta de la planta al estrés salino. Goowik, 2006 realizó un análisis de la pep-c4 en el género *Althernantera*, el cual como *Flaveria* posee especies con distinto tipo metabólico, reportándose fragmentos de la región codificante así como de la región 3' no traducida de isogenes PEP-C₄ ortólogos amplificados de la hoja. En este trabajo se reportó que *A. sesiles* (metabolismo C₃) codifica solamente una copia de la ppc4 sugiriendo que la formación de múltiples isoformas 4 en *A. tenella* (C₃-C₄) y *A. pungens* (C₄) se debió a duplicaciones y modificaciones del genoma del ancestro C₃ (Goowik,

2006), otra posibilidad es que este último ancestro C_3 común a las tres especies contuvo alrededor de dos tipos de genes *ppc4* uno de los cuales se perdió (Wolfe, 2001), sin embargo debido a que actualmente no han sido caracterizados todos los miembros de esta familia de genes, no se puede probar alguna hipótesis.

7.4.3.8 Clado *Orchidaceae*

El clado *Orchidaceae* apoyado por bootstrap de 100 contiene únicamente dos secuencias de *Phalaenopsis amabilis* y *P. equestris* (CAC83482 y CAC83481, Wu, 2001) el banco de genes no especifica de que parte de la planta se amplificaron ni si corresponden a isoformas 3 o CAM. La secuencia CAA60626 pertenece a *Vanilla planifolia* (Gehrig *et al.*, 1998) también *Orchidaceae*, que sin embargo no esta incorporada a ningún clado, ese gen codifica la isoforma *ppc1* que es altamente expresada en órganos que realizan fotosíntesis CAM como hojas y tallos. Se determinó la distancia genética *p* de las secuencias involucradas en el metabolismo CAM (cuadro 10) mostrando que la distancia *p* entre *P. equestris* y *P. amabilis* es de 0.001 y se debe a una sustitución M x L cerca del dominio QNTG. Por otro lado, la distancia *p* entre las *ppc1* y 2 de *M. crystallinum* es de 0.169; la comparación de las distancias genéticas sugiere que las secuencias de *amabilis* y *equestris* pertenecen a la misma isoforma aún que no se puede establecer con este análisis si son formas 1 o 2.

Cuadro 10 Distancias genéticas de secuencias de *Mesembrianthemum* y *Phalaenopsis*

	Dentro del grupo	Entre grupos		
Gp 1	0		1	2
Gp 2	0	2	0.169	
Gp 3	0.001	3	0.160	0.132

Los cálculos de distancias genéticas *p* incluyen los 955 sitios de las 6 secuencias distribuidas en: grupo 1, 3 secuencias de *M. crystallinum* (*ppc1*); grupo 2, 2 secuencias de *M. crystallinum* (*ppc2*) y grupo 3, 2 secuencias de *Phalaenopsis*.

7.4.3.9 Clado *Asteraceae*

El clado *Asteraceae*, apoyado con bootstrap de 100 y distancia genética intragrupal de 0.034, está integrado por 6 secuencias de especies del género *Flaveria* (*Asteraceae*) las cuales presentan metabolismo C₃, C₄ e intermedio y se dividen en 2 grupos, uno está integrado por dos secuencias que codifican isoformas tipo 4 en *F. pringley* (CAA88829, Svensson *et al.*, 1997., Q01647, Hermans y Westhoff, 1992), interesantemente esta especie presenta metabolismo C₃, la distancia genética entre éstas secuencias es de 0.001 (cuadro 11) y el alineamiento muestra sólo 2 sustituciones. El otro grupo está integrado por 4 secuencias, de especies tolerantes a la salinidad, que codifican isoformas tipo 4 en *F. trinervia* (CAA43601, Poetsch *et al.*, 1991), *F. australasica* (CAA81072, Bauwe 1993), *F. pubescens* (AAM14597, Engelmann *et al.*, 2003) y *Flaveria brownii* (AAM14596, Engelmann *et al.*, 2003), las dos primeras especies presentan metabolismo C₄, mientras que las últimas presentan metabolismo intermedio. El árbol indica que las secuencias de *F. trinervia* y *F. australasica* poseen un ancestro derivado del ancestro de las isoformas de *F. pubescens* y *Flaveria brownii*. La distancia genética del clado indica que las sustituciones de aminoácidos de las isoformas C₄ en estas especies son mínimas aún cuando su tipo fotosintético sea C₃, C₄ o intermedio y sugiere que las diferencias en el nivel genético radican en las regiones regulatorias y se manifiesta por tanto en los niveles de expresión en distintas condiciones. Engelmann *et al.*, 2003, mediante un análisis tipo northern blot mostraron que los niveles de expresión del gen son mayores en las especies intermedias y C₄ que en C₃ aún en condiciones similares. Por otro lado Gowik, *et al.*, 2004 analizaron el promotor del gen que codifica la isoforma 4 en este género a través del gen reportero B-glucoronidasa encontrando que en especies con metabolismo C₄, como *F. trinervia*, la expresión de este promotor es alto y específico para el mesófilo, mientras que en especies C₃ como *F. pringley* la expresión es baja y no es órgano específica. El análisis reveló que el gen ppc contiene 2 regiones: 1 región proximal (RP) -570 y una región distal (RD) -1566 a -2541 (ambas con referencia al codón de inicio que flanquea la región 5). Estas regiones cys son módulos regulatorios esenciales para la expresión alta y específica del gen, se encontró que la región distal en las especies C₄ e intermedias posee un tetranucleótido CACT que aumenta la expresión del promotor y esencial para la expresión en el mesófilo, mientras que las plantas C₃ (*F. pringley* y *F. cronquistii*) carecen de ella. Estas evidencias sugieren que la inserción de ese tetranucleótido en el promotor durante la evolución C₃ a C₄ creó un nuevo elemento cys regulatorio que fue determinante en la expresión de los genes de especies C₄ (PEP- C₄).

Cuadro 11 Distancias genéticas de *Flaveria*

Dentro del grupo		Entre grupos	
Gp 1	0.036	1	
Gp 2	0.001	2	0.034

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 966 sitios de las 6 secuencias distribuidas en: grupo 1, 4 secuencias; grupo 2, 2 secuencias.

7.4.3.10 Clado Gimnospermas

El clado *Gimnospermas* apoyado con bootstrap de 67 esta integrado por 2 grupos, el primero contiene tres secuencias, dos de *Picea abies* (AAD5696 Pisen y Ziegenhagen, 1999) y P51063 Relle *et al.* 1996) que al parecer poseen un ancestro del que también se originó la secuencia de *Welwischia mirabilis* (CAA62747 Gehrig, 1995). *Welwischia* es una planta cuya ubicación taxonómica no esta bien definida, es considerada gimnosperma, realiza metabolismo CAM (Gehrig *et al.*, 1998) y está distribuida en el desierto de Namibia en África donde las precipitaciones anuales son menores a 25mm anuales y las temperaturas de 65°C, por la que la planta presenta raíces que alcanzan los 30 m, gran cantidad de estomas en sus hojas largas y fibrosas para absorber agua, que le permiten sobrevivir bajo condiciones de estrés. La distancia genética entre los miembros de este grupo 0.073 (cuadro 12) sugiere un grupo homogéneo; por otra parte, el banco de genes no especifica el origen de la secuencia de *W. mirabilis* ni si corresponde a formas C₃ o CAM, sin embargo y considerando que las otras secuencias de este grupo pertenecen a *P. abies*, la cual es una planta con metabolismo C₃ que se encuentra en climas templados, podríamos deducir que la secuencia de *W. mirabilis* podría corresponder con una secuencia C₃, alternativamente, si participa en el metabolismo CAM, podría representar una secuencia que se derivó del ancestro que se duplicó y que originó a estas dos formas genéticas. El segundo grupo contiene 3 secuencias parálogas de *Hydrilla verticillata* (Rao *et al.*, 2005) las cuales han sido caracterizadas funcionalmente en hojas sometidas a estrés. *H. verticillata* es una planta con metabolismo C₃ que cuando disminuyen las concentraciones de CO₂ modifica su metabolismo a C₄ (Bowes y Salvucci, 1989; Reiskind *et al.*, 1997 citado en Ueno, 2001) en la cual en el ciclo de Calvin y C₄ coexisten en un mismo tipo celular (sin anatomía kranz); de esta manera, la isoforma *ppc4* se expresa solo cuando las hojas exhiben metabolismo C₄, la *ppc3* se expresa en hojas C₃ y C₄; por otro lado, la forma *ppc5* fue aislada de raíz sugiriendo que esta forma se expresa exclusivamente en ese órgano. La

estructura de esta parte del clado sugiere que la *ppc4* (AAK58636) diverge de las isoformas *ppc3* (AAK58635) y *ppc5* (AAK58637) acumulando 44 sustituciones y dos deleciones, sin embargo carece del residuo de Ser en la posición 774 que constituye la firma C₄ en las isoformas de *Trinervia* y *Z. mays*. De acuerdo a Gehrig *et al.*, 1998, el metabolismo C₄ coincide con la aparición de las angiospermas, por lo que la presencia de una isoforma *ppc4* en la gimnosperma *hydrilla* podría ser considerado como un indicio de que esos genes *ppc4* pudieron haberse originado antes de la fotosíntesis C₄ incluso sin la distribución tisular Kranz característica (Rao *et al.*, 2005).

Cuadro 12 Distancias genéticas de secuencias de secuencias de Gimnospermas

Dentro del grupo		Entre grupos	
Gp 1	0.073	1	
Gp 2	0.032	2	0.143

Los cálculos de distancias genéticas p incluyen los 942 sitios de las 6 secuencias distribuidas en: grupo 1, 3 secuencias; grupo 2, 3 secuencias.

Eleocharis vivípara como *H. verticillata* es una gimnosperma que puede modificar su tipo fotosintético incluso su estructura anatómica en condiciones especiales; en ambiente terrestre muestra metabolismo C₄ y anatomía kranz mientras que en condiciones acuáticas presenta metabolismo y anatomía C₃. Experimentos realizados con fluctuaciones de C¹² y C¹⁴ mostraron que las plantas terrestres forman aspartato y malato como productos iniciales (C₄) y las plantas sumergidas forman glucosa 6 fosfato (C₃) (Ueno *et al.*, 1988). Por otro lado, pruebas de detección inmunológica indicaron que en la forma terrestre, la Rubisco esta inusualmente presente en las células de mesófilo donde además se detectó alta actividad de PEPC. En las formas acuáticas la Rubisco es expresada en niveles elevados, los tallos carecen de estomas y los paquetes vasculares son reducidos en talla y número, el CO₂ es fijado por Rubisco (C₃), sin embargo también se presenta fijación por vía C₄ en poca cantidad (Ueno, 2001). Ambas formas estan altamente reguladas a nivel transcripcional (Uchino *et al.*, 1998), los tallos sumergidos muestran altos niveles de expresión de Rubisco (C₃) mientras los aéreos presentan alta expresión de PEP-C; esto evidencia que los cambios metabólicos observados se encuentran regulados por los niveles de expresión de los genes de Rubisco y PEPC. El árbol filogenético sugiere que la secuencia de *E. vivípara* (BAC19851, Agarie *et al.*, 2002) diverge del ancestro común antes de las *ppc* del resto de las secuencias analizadas. En este sentido Engelman

2003 y otros autores han propuesto que el metabolismo C₃ es ancestro tanto del C₄ como del CAM por lo que podríamos suponer que la secuencia de *E. vivipara* participara en el metabolismo C₃ y de esa manera explicaríamos su posición en el árbol, sin embargo el análisis de su secuencia nos muestra que en la posición 774 contiene un residuo de serina la cual ha sido relacionada con las formas C₄ de *Flaveria* y otros géneros (Engelman, 2003).

Las secuencias PEPC de especies de la familia *Brassicaceae* se distribuyeron en al menos dos clados, sugiriendo que en estas especies, posterior a la duplicación de los genes ha ocurrido una divergencia paulatina. El clado más numeroso está apoyado con bootstrap de 97, y está integrado por 6 secuencias de los géneros *Brassica* y *Arabidopsis*. De interés especial resulta la distribución de los genes parálogos *ppc1* y *3* de *A. thaliana* (NP 001031179 y Q9MAH0, Sánchez y Cejudo, 2003.) las cuales se agrupan junto con dos de *Brassica juncea* (CAA11414 y CAA11415, Heiss 1998) adicionalmente, dentro de este clado, el segundo grupo contiene 2 secuencias que codifican isoformas *ppc3* de *Arabidopsis thaliana* (NP 188112 y Q84VW9, Paterson y Nimmo, 1998). Las isoformas de *A. thaliana* han sido caracterizadas fisiológicamente (Sánchez y Cejudo, 2003; Sánchez *et al.*, 2006) reportando que las isoformas incluidas en este grupo modifican sus patrones de expresión cuando la planta se somete a estrés salino mientras que no son modificados por el estrés por sequía. El gen parálogo *ppc2* de *Arabidopsis thaliana* (Q5GM68, Sánchez y Cejudo, 2003.) se localiza en el clado *Brassicaceae* II junto con una secuencia de *Brassica napus* (BAA03094 Yanai *et al.*, 1994). La isoforma *ppc2* de *A. thaliana* corresponde con un gen de expresión constitutiva que probablemente no está involucrada en la adaptación de la planta al estrés ambiental (Sánchez y Cejudo, 2006).

Las PEPC analizadas a la fecha pueden ser agrupadas en dos formas básicas: las denominadas tipo bacteriano y las de plantas. Las formas tipo bacteriano se distinguen por la ausencia del residuo S en el dominio N terminal que forma parte del motif SIDAQLR, el cual es clave para la fosforilación reversible de la enzima en las formas tipo planta; la fosforilación de ese residuo es un mecanismo regulatorio en plantas C₄ y CAM; por el sitio de fosforilación en el dominio C terminal QNTG el cual muestra una sustitución del aminoácido Q en las formas bacterianas y por la presencia de más intrones en las PEPC tipo bacteriano.

Curiosamente, en *Oriza sativa* y en *A. thaliana* se han reportado secuencias de ambos tipos, en este análisis la forma bacteriana de *A. thaliana*, se encuentra en la base del árbol derivándose de las secuencias de *E. coli* y *Thermus sp* utilizadas como outgroup. En *A. thaliana* la *ppc4* se

expresa en hojas en bajos niveles normalmente a diferencia de las PEP-C típicas de plantas, posiblemente por esta razón no había sido encontrado, sin embargo se realizó un análisis fisiológico encontrando que se modifican significativamente sus patrones de expresión cuando la planta es sometida a estrés salino e hídrico. La ubicación en el árbol de estas *pepc4* de *A. thaliana* sugiere un origen independiente, sin embargo el alineamiento de las secuencias de las *pepc4* de *A. thaliana* muestra una mayor similitud a las *pepc* de plantas (48.5% de identidad) que a las secuencias bacterianas (48%) indicando que el ancestro de las PEPC de plantas es evolutivamente más cercano al de las formas de *A. thaliana* que a las PEPC de bacterias (Sánchez y Cejudo, 2003).

7.5 Análisis de las firmas PEPC I y PEPCII en las secuencias

Las fosfoenol piruvato carboxilasa bacterianas y de plantas muestran regiones conservadas a las que se ha denominado firmas PEP I y PEPCII, por otro lado análisis de mutagénesis sitio dirigida han mostrado que al menos los residuos de histidina en la posición 138 y 579 están involucrados en los pasos de la reacción de carboxilación de la enzima. Los residuos ([VTI]-x-T- A-H-P-T-[EQ]-x(2)-R-[KRHAQ]) en torno a la histidina 138 están altamente conservados por lo que han sido como secuencias firma (PEPC I) de estas enzimas, otra secuencia altamente conservada (IVLC]-M-[LIVM]-G-Y-S-D-S-x-K-[DF]-[STAG] - G) contiene a un residuo de Lisina y también ha sido involucrada en la actividad enzimática, a esta secuencia se le ha denominado firma PEPCII.

Con la finalidad de establecer la presencia de ambas secuencias conservadas en las secuencias analizadas se utilizaron las herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio [PROSITE](http://prosite.expasy.org/) del [Swiss Institute of Bioinformatics](http://www.expasy.org/) (SIB) el cual se dedica al análisis de secuencias y de la estructura de proteínas. La base de datos PROSITE contiene información de familias de proteínas y de dominios funcionales. Se basa en que las proteínas pueden ser agrupadas en familias con base en la similitud de sus secuencias y que los dominios de una familia en particular generalmente muestran atributos funcionales que se han derivado de un ancestro común. De esta manera, cuando se estudian secuencias de una familia en particular, se hace evidente que algunas regiones han sido mejor conservadas que otras durante su curso evolutivo, esas regiones son generalmente las más importantes para su función o para el mantenimiento de su estructura tridimensional. Para analizar propiedades constantes y variables en una familia de secuencias similares, es posible analizar una señal o dominio que las distingue de otras familias.

De esta manera las firmas o dominios conservados pueden ser usados para asignar una secuencia a una familia particular o bien para establecer hipótesis en torno a su función.

Con la finalidad de establecer el grado de divergencia entre las secuencias analizadas en este trabajo, se utilizó esta base de datos, los resultados se presentan en el apéndice II; la mayoría de las secuencias presentan las firmas PEP-case I y PEP-case II, las cuales contienen 12 aminoácidos, la firma PEP-case I posee el residuo activo H y el dominio PEP-C II el residuo activo K, en todos los casos ambos residuos son invariantes. Adicionalmente, se realizó un alineamiento de ambas firmas agrupando a las secuencias de acuerdo a su distribución en los clados (fig. 30), los resultados muestran que las firmas son conservadas entre las secuencias de los clados (figuras 28, 29 y 30) y que en algunos casos existen diferencias entre éstos. De manera interesante, este análisis mostró que la secuencia *E. vivípara* (BAC19851) posee solo la firma PEP-case I, mientras que las de *W. mirabilis* (CAA72747) y *B. juncea* (CAA11414) poseen solo la firma PEP-case II. El análisis de los residuos en esas regiones mostró sustituciones e inserciones de aminoácidos: Se utilizó el programa **WORBENCH** (<http://workbench.sdsc.edu/>) para obtener las estructuras secundarias de las secuencias mencionadas a fin de analizar las regiones de las firmas, los resultados se observan en la figura 31 mostrando de 1 a dos sustituciones que podrían estar relacionadas con las afinidad por sustratos por ejemplo CO₂, pero no afectan la funcionalidad de la proteína.

Figura 30 Firmas PPCI y PPCII de los clados *Solanaceae*, *Azoideaceae*, *Orchidaceae*, *Amarantacea/Azoideaceae*, *Asteraceae*, Gimnospermas, *Brassicaceae* I y II, Raíz del árbol.

	PPCI	PPCII
	*	*
	180	600
Solanaceae		
<i>Solanum tuberosum</i> CAA47437	:.....
<i>Solanum tuberosum</i> ppc1 P29196	:.....
<i>S. lycopersicum</i> ppc1 CAB65170	:.....
<i>Nicotiana Tabacum</i> CAA41758	:.....	..V.....
<i>Solanum lycopersicum</i> ppc2 CAC86034	:.F.....AI..
<i>S. lycopersicum</i> ppc2 CAB65171	:.F.....AI..
<i>Solanum tuberosum</i> ppc2 CAA09807	:.F.....AT..
	V TAHPTQ RR	VMiGYSDSGKDA

	PPCI	PPCII
	* 180	600
<i>Alternanthera ficoidea</i> ppc4 AAY28730:.....	
<i>Alternanthera pungens</i> ppc4 AAY28729:.....	
<i>Amaranthus hypochondriacus</i> ppc4 AAB18633 :.....	
<i>Bienertia Sinuspersici</i> ABG20459:.....	
Amarantaceae/ <i>Sesuvium portulacastrum</i> ABG01962:.....	
Azoideaceae <i>M. Crystallinum</i> ppc1 < P10490 :.F.....	
	CAA32727 :.F.....
	V TAHPTQSVRRS	VMIGYSDSGKDAG

	* 180	600
<i>Flaveria pringlei</i> ppc4 < CAA88829 :
	Q01647 :
Asteraceae <i>Flaveria pubescens</i> ppc4 AAM14597 :
	<i>Flaveria brownii</i> ppc4 AAM14596 :
	<i>Flaveria australasica</i> CAA81072 :
	<i>Flaveria trinervia</i> ppc4 CAA43601 :
	VLTAHPTQSVRRS	MIGYSDSGKDAG

	180	600
<i>Hydrilla verticillata</i> < ppc5 AAK58637 :
	ppc3 AAK58635 :
	ppc4 AAK58636 :
Gymnosperms <i>Picea abies</i> < AAD45696 :	V..
	P51063 :	V..
	Welwitschia mirabilis CAA62747 :	HQS-V
	VLTAHPTqs rr	VMiGYSDSGKDAG

	* 180	600
<i>Arabidopsis thaliana</i> ppc1 < Q9MAH0 :
	NP 001031179 :
Brassicaceae I <i>Brassica juncea</i> < ppc2 CAA11414 :	P.
	ppc3 CAA11415 :
<i>Arabidopsis thaliana</i> ppc3 < Q84VW9 :
	NP 188112 :
	VLTAHPTQSVRRS	VMIGYSDSGKDAG

	180	*
<i>Arabidopsis thaliana</i> ppc4 NP 177043 :V.....
<i>Arabidopsis thaliana</i> ppc4 Q8GVE8 :V.....
Eleocharis vivipara BAC19851 :	SV..N.....
Raiz del arbol <i>E. coli</i> P00864 :	E.T..A....
	<i>Thermus</i> sp JC4169 : TF.....	ETR..
	vLTAHPT RR	M GYSdS KDAG

Figura 31 Estructura secundaria de las secuencias de *B. juncea*, *E. vivipara* y *W. mirabilis* de las regiones de aminoácidos correspondientes a las firmas PEP-case I y II, los cuadros muestran los aminoácidos probablemente involucrados en la pérdida de la secuencia firma.

DOMINIO I

		170	.	180	
<i>B. napus</i>	BAA03094	VLTAHPPQSVRR			EEEECCCTTCEEE
<i>E. Vivipara</i>	BAC19851	VLTAHPTQSVRR			EEEECCCTCCEEE
<i>W. Mirabilis</i>	CAA62747	VLTAHPTHQSVLL			EEEECCCTCTCHHEE

DOMINIO II

		.	600	
<i>B. napus</i>	BAA03094	VMIGYSDSGKDAG		EEEECTCTTTCC
<i>E. Vivipara</i>	BAC19851	VMIGYSNSGKDAG		EEEECTCCTTTEE
<i>W. Mirabilis</i>	CAA62747	VMGGYSDSGKDAG		EEETCCTCTTCCC

H - Alpha-helices
 E - Beta-Strands
 C - Coil
 T - Beta-Turns

VIII CONCLUSIONES

- No se lograron caracterizar fragmentos de Rubisco y PEPC, sin embargo, las secuencias poseen una identidad de un 80% a una dehidrina, denominada LEA tipo II, la que no se conoce su función. Algunas dehidrinas están involucradas en la eliminación de radicales hidroxilo, protegen la membrana lipídica contra de peroxidación, otras facilitan la aclimatación de la planta al frío.
- Se desconoce si Rubisco y PEPC de ambas especies estudiadas están involucradas en la adaptación de estas plantas a ambientes estresantes, Sin embargo en el análisis filogenético se encontró que la PEPC posee isoformas que se expresan diferencialmente en algunas plantas expuestas a algún tipo de estrés hídrico, salino, en bajas concentraciones de CO₂. Por lo tanto la PEPC se podría utilizar como un marcador molecular.
- Debido a que Rubisco es una proteína con importancia funcional, esta presenta un alto grado de conservación y tiene un origen polifiletico por lo tanto no permite evidenciar la evolución de las especies.
- PEPC no permite inferir la historia evolutiva de grupos diversos, dado que esas isoformas han tenido origen independiente, por otro lado todavía no se han caracterizado los homólogos dentro de muchos grupos lo cual permitiría establecer la historia de formas específicas dentro de grupos íntimamente relacionados.
- Sustituciones de aminoácidos de las isoformas C₄ en especies como *Flaveria* son mínimas aún cuando su tipo fotosintético sea C₃, C₄ o intermedio, sugiriendo que las diferencias en el nivel genético radican en las regiones regulatorias y se manifiesta por tanto en los niveles de expresión en distintas condiciones.
- De acuerdo al análisis del porcentaje de los residuos de aminoácidos en las secuencias de *Solanaceas*, indica que las ppc2 son mas afines a formas fotosintéticas C₃, se observó que la designación de isoformas ppc1, 2 ,3 ,4 se realiza de acuerdo al número de isoformas reportadas por los investigadores y no corresponden a la relación o función metabólica.
- La plasticidad metabólica mostrada por algunas especies como *E. vivipara* e *H. verticillata* sugieren que los metabolismos no son totalmente C₃ o C₄, existen muchas variantes.

- La presencia de formas PEPC bacterianas en *A. thaliana* y su baja expresión en hojas nos indica que aun no han sido caracterizadas todas las isoformas presentes en las plantas.
- Las firmas PEPCI y PEPCII presentes en las secuencias muestran un grado de conservación alto de acuerdo a los clados obtenidos, mientras que las firmas de RUBISCO LARGA son conservadas en todas las especies.
- No se logró amplificar y caracterizar a la PEPC, probablemente se deba a la poca especificidad de los oligonucleótidos.

REFERENCIAS

Acevedo A.; Paleo A. D. and Federico M. L. 2001. Catalase deficiency reduces survival and pleiotropically affects agronomic performance in field-grown barley progeny. *Plant Sci.* 160, 847-855.

Andersson I., Knight S., Schneider G., Lindqvist Y., Lundqvist T., Branden C.- I. and Lorimer G. H. 1989. Nature 337,229-234 citado en Hudson S. G.; Mahon D. J.; Anderson A. P.; Gibbs J. M.; Badger R. M.; Andrews J. T. and Whitfeld R. P. 1990. Comparison of rbcL genes for the large subunit of Ribulose-bisphosphate carboxylase from closely related C₃ and C₄ plant species. *Journal Bio. Chemistry.* 265: 808-814.

Arias T. A. A. 2000. Las plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla. Un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México, D.F. Folleto 72p, Tesis 47p.

Ashida H.; Saito Y.; Kojima C.; Kobayashi K.; Ogasawara N. and Koyota A. 2003. A functional link between RuBisCO-like protein of Bacillus and Photosynthetic RuBisCO. *Reports.* 302: 286-290.

Besnard G.; Offmann B.; Robert C.; Rouch C. and Cadet F. 2002. Assessment of the C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene diversity in grasses (*Poaceae*). *Theor Appl Genet* 105:404–412

Bowes G; and Salvucci M. E. 1989. Plasticity in the photosynthetic carbon metabolism of submerged aquatic macrophytes. *Aquat Bot* 34: 233–266. Citado en Ueno O. 2001. Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiology Vol.* 127, pp. 1524–1532.

Brulfert J.; and Queiroz O. 1982. Photoperiodism and Crassulacean acid metabolism. III. Different characteristics of the photoperiod-sensitive and non-sensitive isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase and crassulacean acid metabolism operation. *Planta* 154, 339-343.

Calderón de R. G y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro (Michoacán). 1406p.

Chollet R. and Vidal J. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:273–98

Cushman J. C. and Bohnert H. J. 1999. Crassulacean Acid Metabolism: Molecular Genetics. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 50:305-332.

Cushman and Borland. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant cell and environment.* 25, 295-310.

Cushman J. C.; Meyer G.; Michalowski C. B.; Schmitt J. M. and Bohnert H. J. 1989. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of Phosphoenolpyruvate Carboxylase during Crassulacean Acid Metabolism induction in the common ice plant. *The Plant Cell*, Vol. 1, 715-725.

Dávila P.; Villaseñor J. L.; Medina R.; Ramírez A.; Salinas A.; Sanchez-Ken J. M. y Tenorio P. 1993. Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán Cuicatlán. Instituto de Biología. UNAM. Citado en: Labrada A. (2005) Propagación in vitro de *Parkinsonia praecox* (Ruiz and Pavon) Hawkins (*Cesalaspiniaceae*) del Valle de Zapotitlán Salinas Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. Fes Iztacala UNAM.

Engelman S.; Blasing E. O.; Gowik U.; Svensson P. and Westhoff P. 2003. Molecular evolution of C4 phosphoenol pyruvate carboxylase in the genus *Flaveria* — a gradual increase from C3 to C4 characteristics. *Planta.* 217: 717–725.

Flores O. C.; Hernández P. L.; Urzúa M. M.; Moreno. M. R.; Quintanar Z. R.; Rojas. M. L. y Vélez R. A. 2004. Determinación de parámetros fotosintéticos de especies C₃ del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Systematic Botany*. En prensa.

Galtier N.; Gouy M. and Gautier C. 1996 SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics.* 12: 543-548.

Gehrig H.; Faist K. and Kluge M. 1998. Identification of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in leaf, stem and roots of the obligate CAM plant *Vanilla planifolia* Salib. *Orchidaceae*: a physiological and molecular approach. *Plant Molecular Biology*. 38: 1215-1223.

Gehrig H.; Heute V. and Kluge M. 1998. Toward a better knowledge of the molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase by comparison of partial cDNA sequences. *J Mol Evol* 46:107–114

Gerald E.; Vincent R. and Voznesenska E. 2004 Single-Cell C₄ Photosynthesis versus the dual-cell kranz paradigm. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55:173-196.

Golubov J.; Mandujano M. and Eguiarte L. 2001 The paradox of mezquites (*Prosopis* sp.): Invading species of biodiversity enhancer?. *Boletín de la Sociedad Mexicana de México*. 69:23-30.

Good A. S.; Souza V.; Brandon S.; Gaut S. B. and Eguiarte E. L. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (*Agavaceae*). *PNAS*. Vol 103: 9124–9129.

Gowik U.; Engelmann S.; Blasing O. E.; Raghavendra A. S. and Westhoff P. 2006. Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in the genus *Alternanthera*: gene families and the enzymatic characteristics of the C₄ isozyme and its orthologues in C₃ and C₃/C₄ *Alternantheras*. *Planta* 223: 359–368

Gowik U.; Burscheidt J.; Akyildiz M.; Schlue U.; Koczor M.; Streubel M. and Westhoff P. 2004. Cis-regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C₄ plant *flaveria trinervia*, the promoter of the C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *The Plant Cell*. Vol. 16, 1077–1090.

Haston M. E.; Elspeth M.; Lewis P. G. and Hawkins A. J. 2005. A phylogenetic reappraisal of the *peltophorum* group (*Caesalpinieae: leguminosae*) based on the chloroplast *trnI-f*, *rbcl* and *rps16* sequence data. *American Journal of Botany* 92(8): 1359–1371.

Gueta-Dahan Y.; Yaniv Z.; Zilinskas B. A. and Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203, 460-469.

Hess D. T. 1980. *Vegetal*. Ed Omega, S. A. Barcelona España. 388 pp.

Honda H.; Okamoto T. and Shimada H. 1986. Isolation of a cDNA for a phosphoenol-pyruvate carboxylase from a monocot CAM plant, *Aloe arborescens*: structure and its gene expression. *Plant Cell Physiol.* 37:881-888.

Hudson S. G.; Mahon D. J.; Anderson A. P.; Gibbs J. M.; Badger R. M.; Andrews J. T. and Whitfield R. P. 1990. Comparison of rbcL genes for the large subunit of Ribulose-bisphosphate carboxylase from closely related C₃ and C₄ plant species. *Journal Bio. Chemistry.* 265: 808-814.

Katsura Izui K.; Matsumura H.; Furumoto T. and Kai Y. Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. 55:69–84

Kawamura T.; Shigesada K.; Toh H.; Okumura S.; Yanagisawa S. and Izui K. 1992. Molecular evolution of Phosphoenolpyruvate carboxylase for C₄ photosynthesis in maize: Comparison of its cDNA sequence with a new isolated cDNA encoding an Isozyme involved in the anaplerotic function. *J. Biochem.* 112, 147-154.

Kim Y. S.; Park R. M.; Kim J. Y.; Park II T.; Seo W. Y.; Choi G. K. and Yun J. S. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 2, pp. 218-224

Ku S. M.; Kano-Murakami Y. and Matsuoka M. 1996. Evolution and expression of C₄ photosynthesis genes. *Plant Physiol.* 111: 949-957.

Lara M. V.; Drincovich M. F and Andreo C. S. 2004. Induction of a crassulacean acid-like metabolism in the C(4) succulent plant, *Portulaca oleracea* L: study of enzymes involved in carbon fixation and carbohydrate metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2004 May; 45 (5):618-26.

Lewis G.; Schrire B.; MacKinder B. and Lock M. (eds). 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.

Logemann J.; Schell U. and Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry.* 163:16-20.

Maldonado-Aguirre L. y de la Garza F. 2000. El mezquite en México: rasgos de importancia productiva y necesidades de desarrollo. En: Frias-Hernández, J.T. Olalde Portugal, V. y Vernon-Carte, E. J. El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato. México 37-50 pp.

Marulanda A.; Porcel R.; Barea M. and Azcón R. 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive glomus species. *Microbial Ecology*.

McKey D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. Pages 211–228 in *Advances in Legume Systematics*, part 5, the nitrogen factor (J. I. Sprent and D. McKey, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Mittova V.; Guy M.; Tal M. and Volokita M. 2004. Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *J. Exp. Bot.* 55, 1105-1113.

Nakagawa T.; Izumi T.; Banba M.; Umehara Y.; Kouchi H.; Izuin K. and Hata S. 2003. Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a Model Legume. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 16, No. 4, 2003, pp. 281–288.

Nicholas K. B. and Nicholas H.B. Jr. 1997 *Gene Doc*: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.

Olalde Portugal V. y Vernon-Carte E. J. El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato. México 37-50 pp.

Paredes F. M. 2001. Contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán de las Salinas Puebla. Tesis de Licenciatura. Fes Iztacala. UNAM

Peñaloza E.; Muñoz G.; Salvo-Garrido H.; Silva H. and Corcuera L. J. 2005. Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expression in proteoid root clusters of white lupin. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56: 145–153.

Polhill R. M. 1994. Classification of the *Leguminosae*. Pages xxxv–xlvi in *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae* (F. A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne, eds.). Chapman and Hall, New York, NY.

Rao K. S.; Magnin C. N.; Reiskind B. J. and Bowes G. 2002. Photosynthetic and other Phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C₄ system of *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol.* Vol. 130

Reiskind JB, Madsen TV, van Ginkel LC, Bowes G. 1997. Evidence that inducible C₄-type photosynthesis is a chloroplastic CO₂-concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot. *Plant Cell Environ* 20: 211–220. citado en Ueno O. 2001. Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiology* Vol. 127, pp. 1524–1532.

Rickers J.; Cushman J. C.; Michalowski C. B.; Schmitt J. M.; and Bohnert H. J. 1989 Expression of the CAM-form of phosphoenol-pyruvate carboxylase and nucleotide sequence of a full-length cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Mol. Gen. Genet.* 215:447-454.

Rojas-Martínez. 2007. Respuestas fisiológicas y moleculares al estrés por sequía de plántulas de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Wild) M. C. Johnston (*Fabaceae: Mimosoideae*). Tesis de Licenciatura. Biología. Fes Izacala. UNAM.

Roldán M. 2004. Patrones demográficos de *Prosopis levigatae* en un ambiente fragmentado del Valle de Zapotitlan de las salinas Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. Fes Izacala.

Rorat T. 2006. Plant dehydrins – tissue location, structure. *Cellular & molecular biology letters.* 11:536–556.

Rundel P. W. 1989. Ecological success in relation to plant form and function in the woody legumes. In C.H. Stirton and J.L. Zarucchi (eds.). Advances in legume biology, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardens 29: 377-398.

Rzedowski J. 1988. Vegetación de México. México. Limusa. 432p.

Salisbury F. y Ross W. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano. México. 681 pp.

Sambrook J and Russell W. D. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez R. and Cejudo F. J. 2003. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and *Rice*. Plant Physiol. 132:949-957.

Sanchez R.; Flores A. and Cejudo F. J. 2006. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress Planta 223: 901–909.

Schmitt M. and Piepenbrock J. M. 1992. Induction of mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase is correlated with a decrease in shoot water content in well-irrigated *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. 99: 759-761.

Shizozaki K and Sugiura 1982. The nucleotide sequence of the tobacco chloroplast gene for the large subunit of the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/ oxigenase. National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka-Ken 411. Gene 20 (1), 91-102 (1982)

Sipes D. L. and Ting I. P. 1985. Crassulacean metabolism and crassulacean acid metabolism modifications in *Peperomia camptotricha*. Plant Physiol. 77, 59-63.

Spreitzer J. 2002. Rubisco: Structure, regulatory interactions and possibilities for a better enzyme. Annual Review Plant Biology. 53:449-75.

Swofford D. L. 2000. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (software). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Taiz L. and Zeiger E. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Pg. 234-241

Thomson J. D.; Gibson T. J.; Plewniak F.; Jeanmougin F. and Higgins D. G. 1997. The clustal X-Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25: 4876-4882.

Ting I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 595-622.

Ting I. P. and Hanscom Z. 1977. Induction of acid metabolism in *Portulacaria afra*. *Plant Physiol.* 59: 511-514.

Ting I. P. and Rayder L. 1982. Regulation of C₃ to CAM shifts In Crassulacean Acid Metabolism, I. P. Ting and M. Gibbs, eds (Baltimore: Waverly Press), pp. 193-207.

Uchino A.; Sentoku N.; Nemoto K.; Ishii R.; Samejima M. and Matsuoka M. 1998. C₄-type gene expression is not directly dependent on kranz anatomy in an amphibious sedge *Eleocharis vivipara* Link. *Plant J* 14: 565–572.

Ueno O. 2001. Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiology* Vol. 127, pp. 1524–1532.

Ueno O.; Samejima M.; Muto S. and Miyachi S. 1988. Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: Expression of C₄ and C₃ modes in contrasting environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 85, pp. 6733-6737.

Velez-Ramirez. 2007. Respuestas fisiológicas y moleculares de plántulas al estrés por sequía de plántulas de *Parkinsonia praecox* (Ruiz and Pavons) Hawkins. Tesis de Licenciatura. Biología. Fes Iztacala. UNAM.

Wang E. T.; Tan Y. Z.; Guo W. X.; Rodríguez D. R.; Boll G. and Martínez R. E. 2006. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiXora* grown in Mexico. *Arch*

Microbiol (2006) 186:251–259.

Westhoff P. and Gowik U. 2004. Evolution of C₄ Phosphoenolpyruvate carboxylase. genes and Proteins: a case study with the genus *flaveria*. Annals of Botany 93: 13- 23.

Wolfe K. H. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. Nat Rev Genet 2:1–

9

APENDICE I.- Información de las secuencias Rubisco subunidad larga utilizadas para el análisis filogenético.

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA	DOMINIO
AAL35622	Agavaceae	Agave ghiesbreghtii	Soltis, 1999	185 - 193 GIDFtKdDE
P19161	Asteraceae	Flaveria bidentis	Hudson <i>et al.</i> , 1990	196 – 204 GIDFtKdDE
P19162		Flaveria pringlei	“ “	196 – 204 GIDFtKdDE
AAA84115	Cupressaceae	Calocedrus decurrens	Gadek and Quinn, 1993	190 – 198 GIDFtKdDE
AA54078	Fabaceae Caesalpinioideae	Acrocarpus fraxinifolius	Haston <i>et al.</i> , 2005	187 - 195 GIDFtKdDE
AAL56815	Fabaceae	Acrocarpus sp. JJD-2001	Kajita <i>et al.</i> , 2001	184 - 192
AA54096	Fabaceae Papilionoideae	Andira aubletii	Haston <i>et al.</i> , 2005	181 – 189 GIDFtKdDE
AAQ82791	Fabaceae Caesalpinioideae	Balsamocarpon brevifolium	Simpson <i>et al.</i> , 2003	190 – 198 GIDFtKdDE
AA54082	“ “	Batesia floribunda	Haston <i>et al.</i> , 2005	187 - 195 GIDFtKdDE
AA54087	“ “	Caesalpinia coriaria	“ “	185 - 193 GIDFtKdDE
AA54088	“ “	Caesalpinia eriostachys	“ “	188 - 196 GIDFtKdDE
AA54086	“ “	Caesalpinia calycina	“ “	187 - 195 GIDFtKdDE
AAB67915	“ “	Caesalpinia pulcherrima	Doyle <i>et al.</i> , 1997	189 – 197 GIDFtKdDE
CAA94011	“ “	Caesalpinia pulcherrima	Kaess, 1996	187 - 195 GIDFtKdDE
AA54089	“ “	Caesalpinia velutina	“ “	189 - 197 GIDFtKdDE
AA54117	“ “	Cercidium andicola	“ “	192 - 200 GIDFtKdDE
AA54122	“ “	Conzattia multiflora	“ “	185 - 193 GIDFtKdDE
AA54123	“ “	Conzattia multiflora	“ “	194 – 202 GIDFtKdDE
AA54128	“ “	Delonix floribunda	“ “	186 – 194 GIDFtKdDE
CAA94014	“ “	Delonix regia	Kaess, 1996	187 – 195 GIDFtKdDE
AA54126	“ “	Delonix regia	Haston <i>et al.</i> , 2005	194 - 202 GIDFtKdDE
AAB67929	“ “	Erythrophleum ivorense	Doyle <i>et al.</i> , 1997	188 - 196 GIDFtKdDE

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA	DOMINIO
CAA93988	“ “	Gleditsia triacanthos	Kaess, 1996	187 – 195 GIDFtKdDE
AAy54081	“ “	Gleditsia sinensis	Haston <i>et al.</i> , 2005	190 - 198 GIDFtKdDE
AAB67930	“ “	Gymnocladus dioica	Doyle <i>et al.</i> , 1996	186 - 194 GIDFtKdDE
AAy54080	“ “	Gymnocladus dioica	Haston <i>et al.</i> , 2005	191 - 199 GIDFtKdDE
CAA94024	“ “	Gymnocladus dioica	Kaess, 1996	187 - 195 GIDFtKdDE
AAy54090	“ “	Haematoxylum brasiletto	Haston <i>et al.</i> , 2005	181 – 189 GIDFtKdDE
AAy54092	“ “	Haematoxylum campechianum	“ “	185 - 193 GIDFtKdDE
AAQ82794	“ “	Hoffmannseggia drepanocarpa	Simpson <i>et al.</i> , 2003	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82793	“ “	Hoffmannseggia doelli	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82796	“ “	Hoffmannseggia erecta	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82795	“ “	Hoffmannseggia drummondii	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82797	“ “	Hoffmannseggia eremophila	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82798	“ “	Hoffmannseggia glauca	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82798	“ “	Hoffmannseggia glauca	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82799	“ “	Hoffmannseggia glauca	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82800	“ “	Hoffmannseggia humilis	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82801	“ “	Hoffmannseggia intricata	Simpson <i>et al.</i> , 2003	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82802	“ “	Hoffmannseggia microphylla	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82803	“ “	Hoffmannseggia minor	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82804	“ “	Hoffmannseggia miranda	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82805	“ “	Hoffmannseggia oxycarpa subsp. arida	“ “	190 – 198 GIDFtKdDE
AAQ82806	“ “	Hoffmannseggia peninsularis	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE
AAQ82807	“ “	Hoffmannseggia prostrata	“ “	190 - 198 GIDFtKdDE

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA	DOMINIO
AAY54105	“ “	Schizolobium parahyba	“ “	194 – 202 GxDfTKdDE
AAB67962	“ “	Tachigali paniculata	Doyle <i>et al.</i> , 1997	188 – 196 GIDFtKdDE
AAY54079	“ “	Tetraptero carpon geayi	Haston <i>et al.</i> , 2005	187 – 195 GIDFtKdDE
AAQ82814	“ “	Zuccagnia punctata	Simpson <i>et al.</i> , 2003	190 – 198 GIDFtKdDE
AAA33068	Malvaceae	Gossypium hirsutum	Giannasi <i>et al.</i> , 1992	196 – 204 GIDFtKdDE
AAD15025	Solanaceae	Nicotiana tabacum	Shinozaki and Sugiura, 1982	196 – 204 GIDFtKdDE
ABC56308	“ “	Solanum lycopersi cum	Daniell <i>et al.</i> , 2006	196 – 204 GIDFtKdDE

APENDICE II.- Información de las secuencias PEPC utilizadas para el análisis filogenético

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
CAA32727	<i>Aizoaceae</i>	Mesembryanthemum crystallinum	Acumulacion de transcritos ppc1 en estrés	Cushman <i>et al.</i> , 1989	2535520 2780306 8443342 2710107	169 – 180 VfTAHPTQsvRR	592 – 604 VMIGYSDSgKDAG
P10490	""	Mesembryanthemum crystallinum	Ppc1	Rickers <i>et al.</i> , 1989.	2780306 2535520	169 - 180 VfTAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
CAA32728	""	Mesembryanthemum crystallinum	isoforma houskeeping ppc2	Cushman <i>et al.</i> , 1989	2535520 2780305 8443342	161 - 172 VfTAHPTQsvRR	584 – 596 VMIGYSDSgKDAG
P16097	""	Mesembryanthemum crystallinum	Ppc2	Cushman and Bohnert.,1989.	2780305	161 - 172 VfTAHPTQsvRR	584 – 596 VMIGYSDSgKDAG
ABG01962	""	Sesuvium portulacastrum	Aislamiento y caracterización de PEPC en hoja de <i>Sesuvium portulacastrum</i> tratada con NaCl	Sankararamas ubramanian <i>et al.</i> , 2006.		169 – 180 VfTAHPTQsvRR	592 – 604 VMIGYSDSgKDAG
AAY28729	<i>Amaranthaceae</i>	Alternanthera pungens	Ppc4 ortólogos en sp. C3 y C3-C4	Gowik <i>et al.</i> , 2006.	16136331	169 - 180 VfTAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
AAY28730	""	Alternanthera ficoidea	Ppc4 ortólogos en sp C3 y C3-C4	Gowik <i>et al.</i> , 2006.	16136331	169 - 180 VfTAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
AAB18633	""	Amaranthus hypochondriacus		Rydzik and Berry 1996.		168 – 179 VfTAHPTQsvRR	591 – 603 VMIGYSDSgKDAG
ABG20459	""	<i>Bienertia sinuspersici</i>	Ppc4	Lara <i>et al.</i> , 2006.	16920871	169 - 180 VfTAHPTQsvRR	592 – 604 VMIGYSDSgKDAG
CAA81072	<i>Asteraceae</i>	Flaveria australasica	Ppc4	Bauwe., 1993.	9208938	168 - 179 VfTAHPTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
AAM14596	""	Flaveria brownii	Ppc4	Engelmann <i>et al.</i> , 2003.	12811556	168 - 179 VITAHPTQsvRR	591 – 603 VMIGYSDSgKDAG
CAA88829		Flaveria pringlei	genes ortologos entre <i>flaveria tinervia</i> y <i>flaveria pringlei</i>	Svensson P., <i>et al.</i> ,1997	9208938	168 – 179 VITAHPTQsvRR	591 – 603 VMIGYSDSgKDAG
Q01647		Flaveria pringlei	evolucion molecular de <i>Flaveria</i>	Hermans and Westhoff. 1992	1508152	168 – 179 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
AAM14597	""	Flaveria pubescens	niveles de RNAm implicado en la similitud de isoformas del genero <i>Flaveria</i>	Engelmann <i>et al.</i> , 2003.	12811556	168 – 179 VITAHPTQsvRR	591 – 603 VMIGYSDSgKDAG
CAA43601	Asteraceae	Flaveria trinervia	Ppc4 alto grado de similitud a las de CAM de isoenzimas C3 y PEP-C	Poetsch W., <i>et al.</i> ,1991	1720398	168 - 179 VITAHPTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG
NP_001031179	Brassicaceae	Arabidopsis thaliana	Ppc1			169 – 180 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
Q9MAH0	""	Arabidopsis thaliana	Ppc1	Sanchez and Cejudo 2003.	12805623 14593172	169 - 180 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
Q5GM68	""	Arabidopsis thaliana	PPC2	Sanchez and Cejudo 2003.	12805623	168 – 179 VITAHPTQsvRR	590 – 602 VMIGYSDSgKDAG
NP_188112	""	Arabidopsis thaliana	Ppc3			169 - 180 VITAHPTQsvRR	594 – 606 VMIGYSDSgKDAG
Q84VW9	""	Arabidopsis thaliana	Ppc3	Paterson and Nimmo, 1998.	10907853	169 - 180 VITAHPTQsvRR	594 - 606 VMIGYSDSgKDAG
NP_177043	""	Arabidopsis thaliana	Ppc4			150 – 161 VITAHPTQinRR	690 - 702 VMVGYSgKDG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
Q8GVE8	""	Arabidopsis thaliana	PEP-C 4	Sanchez and Cejudo 2003.	12805623 11130712	150 - 161 VITAHPTQinRR	690 – 702 VMVGYSDSgKDG
CAA11415	Brassicaceae	Brassica juncea	Ppc3	Heiss,1998		169 – 180 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
CAA11414	""	Brassica juncea	Ppc2	Heiss,1998			593 – 605 VMIGYSDSgKDAG
BAA03094	""	Brassica napus	intrones causantes de polimorfismos en los miembros de la familia del gen	Yanai <i>et al.</i> , 1994	7764981	168 – 179 VITAHPTQsvRR	590 – 602 VMIGYSDSgKDAG
BAC19851	Cyperaceae	Eleocharis vivipara	regulacion de la expresion del gen de la enzima fotosintetica C4 en semilla	Agarie <i>et al.</i> , 2002		169 - 180 VITAHPTQsvRR	
P00864	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	inhibicion alosterica por L-aspartato	Fujita <i>et al.</i> , 1984	6086598 9927652	134 - 145 VITAHPTQsvRR	537 – 549 VMIGYSDSaKDAG
BAA03100	Fabaceae	Glycine max	pep-c homólogo al gen reportado de soybean	Vazquez-Tello <i>et al.</i> , 1998	8022928	168 – 179 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
Q02909	""	Glycine max		Sugimoto, T., <i>et al.</i> , 1992	1450389	168 – 179 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
AAD31452	""	Lotus corniculatus		Pace <i>et al.</i> , 1999		168 – 179 VITAHPTQsvRR	588 – 600 VMIGYSDSgKDAG
BAC20365	""	Lotus japonicus		Nakagawa T. <i>et al.</i> , 2003	12744456	168 - 179 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
AAO15570	""	Lupinus albus	Ppc1	Uhde-Stone <i>et al.</i> ,2001		168 – 179 VITAHPTQsiRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
AAU07997	""	Lupinus albus	Ppc2	Peñaloza <i>et al.</i> , 2005	15501907	168 – 179 VITAHPTQsiRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
AAU07998	""	Lupinus albus	Ppc3	Peñaloza <i>et al.</i> , 2005	15501907	169 - 180 VITAHPTQsiRR	594 – 606 VMIGYSDSgKDAG
AAU07999	""	Lupinus albus	Ppc4	Peñaloza <i>et al.</i> , 2005	15501907	169 - 180 VITAHPTQsiRR	594 - 606 VMIGYSDSgKDAG
CAJ84247	""	Lupinus luteus	Aislada de nódulo	Kleinert,A. <i>et al.</i> , 2006		168 - 179 VITAHPTQsiRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
CAJ86550	""	Lupinus luteus	Aislada de nódulo Ppc2	Kleinert <i>et al.</i> , 2006		169 – 180 VITAHPTQsiRR	594 – 606 VMIGYSDSgKDAG
AAB46618	""	Medicago sativa	expresion y regulacion metabolica	Pathirana <i>et al.</i> , 1992	1421147	167 - 178 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
ABE82904	""	Medicago truncatula		Shaull <i>et al.</i> , 2002		169 - 180 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
ABE96652.	""	Medicago truncatula		Shaull <i>et al.</i> , 2003		167 - 178 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
AAK28444	""	Phaseolus vulgaris		Blanco and Lara 2000		168 – 179 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
Q9AU12	Fabaceae	Phaseolus vulgaris		Blanco and Lara, 2000		168 – 179 VITAHPTQsvRR	593 – 605 VMIGYSDSgKDAG
BAA10902	""	Pisum sativum		Suganuma <i>et al.</i> ,1997		167 - 178 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
P51062	""	Pisum sativum	Carboxilación de la PEP-C	Suganuma <i>et al.</i> , 1995		167 - 178 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
CAC28225	""	Sesbania rostrata		Aono and Oyaizu, 2000		168 - 179 VITAHPTQsvRR	593 - 605 VMIGYSDSgKDAG
CAA09588	""	Vicia faba	involucrada en el crecimiento de semillas (expresion del gen y regulacion metabolica)	Golombek <i>et al.</i> , 1999	10213002	167 - 178 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
AAK58635	Hydrocharitaceae	Hydrilla verticillata	Ppc3	Rao <i>et al.</i> , 2005	12376652	173 - 184 VITAHPTQsiRR	596 - 608 VMIGYSDSgKDAG
AAK58636	""		Ppc4			171 - 182 VITAHPTQsiRR	594 - 606 VMIGYSDSgKDAG
AAK58637	""		Ppc5			171 - 182 VITAHPTQsiRR	596 - 608 VMIGYSDSgKDAG
CAC83482	Orchidaceae	Phalaenopsis amabilis		Wu, 2001		168 - 179 VfTAHPTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG
CAC83481	""	Phalaenopsis equestris		Wu, 2001		168 - 179 VfTAHPTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG
CAA60626	""	Vanilla planifolia	isoformas relacionadas a funciones especificas	Gehrig <i>et al.</i> , 1998	9869426	162 - 173 VITAHPTQsvRR	584 - 596 VMIGYSDSgKDAG
AAD45696	Pinaceae	Picea abies		Ipsen and Ziegenhagen, 1999		160 - 171 VITAHPTQsvRR	583 - 595 VMIGYSDSgKDAG
P51063	""	Picea abies	Carboxilación de la PEPC	Relle <i>et al.</i> , 1996		168 - 179 VITAHPTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
AAG42288	Poaceae	Chloris gayana		Blaesing <i>et al.</i> , 2000		167 - 178 VITAHPTQsIRR	589 - 601 IMVGYSDSgKDAG
AAG00180	""	Oryza sativa (japonica cultivar-group)		Yamamoto <i>et al.</i> , 2000		163 - 174 VfTAHPTQsvRR	586 - 598 VMIGYSDSgKDAG
AAO25631	Poaceae	Oryza sativa (indica cultivar-group)	expresion y regulacion metabolica	Lin <i>et al.</i> , 2004	15620214	167 - 178 VITAHPTQsvRR	590 - 602 VMIGYSDSgKDAG
BAC24913	""	Oryza sativa (japonica cultivar-group)		Sasaki <i>et al.</i> , 2001		167 - 178 VITAHPTQsvRR	590 - 602 VMIGYSDSgKDAG
P29193	""	Saccharum sp.		Albert H. A., Martin T. and Sun S. S.	1450381	168 - 179 VITAHPTQsvRR	168 - 179 VMIGYSDSgKDAG
AAC33164	""	Saccharum hybrid cultivar H32-8560	expresion y regulacion metabolica	Albert <i>et al.</i> , 2003	1450381	PPC 1 168 - 179 VITAHPTQsvRR	PPC 2 592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
S28614	""	Saccharum hybrid cultivar H32-8560		Albert <i>et al.</i> , 1992	1450381	168 - 179 VITAHPTQsvRR	592 - 604 VMIGYSDSgKDAG
CAC08829	""	Saccharum officinarum	pep-c posible C4	Besnard <i>et al.</i> , 2002	12582545 12376652	163 - 174 VfTAHPTQsaRR	588 - 600 VMVGYSDSgKDA G
CAC85930	""	Saccharum spontaneum	posible pep-c	Besnard <i>et al.</i> , 2002	12582545	163 - 174 VfTAHPTQsaRR	588 - 600 VMVGYSDSgKDA G
AAR84575	Poaceae	Setaria italica		Ding <i>et al.</i> , 2003		165 - 176 VfTAHPTQpvRR	588 - 600 VMIGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
AAM15963	""	Setaria italica	posible ppc4	Ding <i>et al.</i> , 2003		168 – 179 VfTAHPTQsvRR	591 – 603 VMVGYSDSgKDA G
P29193	""	Saccharum sp.		Albert H. A., Martin T. and Sun S. S.	1450381	168 - 179 VITAHTQsvRR	168 - 179 VMIGYSDSgKDAG
P29194	Poaceae	Sorghum bicolor		Lepiniec <i>et al.</i> , 1991	1840686	163 - 174 VITAHTQsvRR	586 – 598 VMIGYSDSgKDAG
P29195	""	Sorghum bicolor		Cretin <i>et al.</i> , 1991	2022326 8443342	164 - 175 VfTAHPTQsvRR	587 – 599 VMIGYSDSgKDAG
P15804	""	Sorghum bicolor		Cretin <i>et al.</i> , 1990	2308851 , 2022326	163 – 174 VfTAHPTQsaRR	588 - 600 VMVGYSDSgKDA G
CAA35251	""	Sorghum bicolor	enzima clave en la via fotosintetica C4	Besnard <i>et al.</i> , 2002	12582545	163 – 174 VfTAHPTQsaRR	588 - 600 VMVGYSDSgKDA G
CAA07610	Poaceae	Triticum aestivum		Cejudo, 1998		175 – 186 VITAHTQsvRR	598 – 610 VMIGYSDSgKDAG
CAA27270	Poaceae	Zea mays	diversidad de la pep-c 4 en pastos (<i>Poaceae</i>)	Besnard <i>et al.</i> , 2002	12582545	138 – 149 VfTAHPTQsaRR	562 - 574 VMVGYSDSgKDA G
CAA33317	""	Zea mays		Hudspeth and Gruha, 1989		173 – 184 VfTAHPTQsaRR	597 – 609 VMVGYSDSgKDA G
CAA33663	""	Zea mays	estructura completa del gen de la pep-c en maíz	Besnard, 1990	2731539	173 – 184 VfTAHPTQsaRR	597 – 609 VMVGYSDSgKDAG

No. ACCESO	FAMILIA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA	ARTICULO	PEPCASE I	PEPCASE II
CAD60555	""	Zea mays	evidencia de poliadenilacion del RNAm en sitios multiples	Yanagisawa <i>et al.</i> , 1998	2894322 1368521 , 9395074	173 - 184 VfTAHPTQsaRR	597 - 609 VMVGYSDSgKDA G
P04711	""	Zea mays	ppc1	Izui <i>et al.</i> , 1986	X15238.1	173 - 184 VfTAHPTQsaRR	597 - 609 VMVGYSDSgKDA G
P51059	""	Zea mays	secuencia que codifica a la isoforma C3	Kawamura <i>et al.</i> , 1992	1429504	170 - 181 VITAHTQsvRR	587 - 599 VMIGYSDSgKDAG
1JQOA	""	Zea mays				173 - 184 VfTAHPTQsaRR	597 - 609 VMVGYSDSgKDA G
1807332A	""	Zea mays	isoenzima involucrada en la fotosintesis C4	Hudspeth and Grula, 1989.		173 - 184 VfTAHPTQsaRR	597 - 609 VMVGYSDSgKDA G
AAB80714	Malvaceae	Gossypium hirsutum		Vodjani <i>et al.</i> , 1997		168 - 179 VITAHTQsvRR	591 - 603 VMIGYSDSgKDAG
JC4169	Thermaceae	Thermus sp	análisis de la secuencia promotora	Nakamura <i>et al.</i> , 1995.	8543565	140 - 151 TfTAHPTetrRR	521 - 533 VMIGYSDSnKDAG
CAA62747	Welwitschiaceae	Welwitschia mirabilis		Gehrig, 1995			579 - 591 VMXGYSDSgKDA G