

Evolución del metabolismo fotosintético C_4 y los estados de transición C_3 - C_4

EDUARDO A. PAGANO*
RICARDO A. WOLOSUK**
y ANA CHUECA SANCHO***

Resumen

La fotosíntesis C_4 evolucionó en diferentes familias de plantas superiores a partir de 45 núcleos independientes. Está ampliamente aceptado que este proceso surgió en ancestros C_3 que adquirieron ventajas adaptativas ante los cambios globales del ambiente, principalmente la disminución del CO_2 atmosférico. Sobre estas bases, las especies cuyo metabolismo presenta características intermedias entre C_3 y C_4 constituyen una herramienta adecuada para establecer los cambios anatómicos y fisiológicos que condujeron a la fotosíntesis C_4 . La presente revisión examina los rasgos estructurales, ecológicos y metabólicos de las plantas C_3 - C_4 típicas y los estados de transición para dilucidar el rol que habrían jugado en la evolución hacia la fotosíntesis C_4 .

Summary

The C_4 photosynthetic pathway evolved in different families of higher plants starting from 45 independent nuclei. It is widely accepted that this process arose from C_3 ancestors that acquired advantages in response to global environmental changes, mainly the decrease of the atmospheric CO_2 . On this basis, species whose metabolism shows intermediate features between C_3 and C_4 constitute an adequate tool to unveil the anatomical and physiological changes that led to C_4 photosynthesis. The present review examines structural, ecological and metabolic features of typical C_3 - C_4 plants and transition states in order to elucidate the role that would play in the evolution towards C_4 photosynthesis.

Introducción

La capacidad de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) para catalizar la oxigenación (ribulosa-1,5-bisfosfato + O_2 → 3-fosfoglic-

cerato + 2-fosfoglicolato) de la ribulosa-1,5-bisfosfato simultáneamente con la carboxilación (ribulosa-1,5-bisfosfato + CO_2 → 2,3-fosfoglicerato) promueve el funcionamiento del ciclo fotorrespiratorio. Como la liberación del CO_2 en este proceso es un efecto diametralmente opuesto a la fotosíntesis, una serie de mecanismos evitan la transferencia del CO_2 a la atmósfera y aumentan su concentración en las cercanías del centro activo de la RUBISCO. Situadas en las membranas plasmáticas de algunos organismos acuáticos (cianobacterias, algas, plantas), ciertas bombas contribuyen a la captación del CO_2 e impiden su liberación. En cambio, dos caminos metabólicos, encontrados mayoritariamente en las plantas terrestres, suplementan el ciclo de Benson-Calvin; el metabolismo CAM, típico de los ambientes desérticos y la fotosíntesis C_4 , encontrada frecuentemente en ambientes tropicales.

La adquisición de ventajas adaptativas por ancestros C_3 (ciclo de Benson-Calvin) para tolerar condiciones extremas del ambiente devino en la aparición de las plantas C_4 . En épocas pretéritas, el descenso del CO_2 atmosférico, las elevadas temperaturas y el déficit hídrico favorecieron la aparición y la expansión de las plantas C_4 . Actualmente, el aumento de la temperatura y la falta de agua previstos por el cambio global promoverían el crecimiento de las plantas C_4 respecto a las plantas C_3 , pero el aumento de los niveles atmosféricos del CO_2 actuaría en sentido inverso. Tal vez estas condiciones ambientales den ventajas adaptativas a especies que no responderán estrictamente a las características de las C_3 —favorecidas por el aumento del CO_2 pero no por las altas temperaturas ni la aridez— o de las C_4 —hábiles a la tolerancia térmica y en el uso del agua pero poco eficientes a elevadas concentraciones de CO_2 —.

La fotosíntesis C_4 está presente en 7500 especies de plantas con flores, (3% de las 250.000 especies de plantas terrestres) constituídas por gramíneas (4500

* Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, 1417-Buenos Aires, Argentina.

** Instituto Leloir, Av. Patricias Argentinas 435, 1405 - Buenos Aires, Argentina.

*** Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1, 18008 - Granada, España.

especies), juncos (1500 especies) y dicotiledóneas (1200 especies) (Sage, 2004). Las variaciones en esta capacidad fotosintética no sólo reconocen 45 orígenes independientes provenientes de 19 familias de plantas superiores sino también presentan estados intermedios entre el metabolismo C_3 y el C_4 . En las últimas tres décadas numerosos estudios analizaron los estados de transición C_3 - C_4 para comprender el proceso evolutivo y con ello obtener la información que haga plausible utilizar estas especies en el diseño de programas de conservación y recuperación de tierras. Esta revisión analiza, primero, el rol que los estados de transición C_3 - C_4 juegan en la evolución de la fotosíntesis C_4 sobre la tierra y, luego, los avances recientes en el conocimiento de las especies representativas.

Evolución del metabolismo C_4

Aunque la presencia de la anatomía Kranz en los restos fósiles permite rastrear el origen de las plantas C_4 , el análisis bioquímico de las especies actuales aporta información valiosa. La discriminación isotópica constituye un procedimiento adecuado para estos estudios por cuanto RUBISCO favorece la asimilación de la forma más abundante (^{12}C) en contra del isótopo pesado (^{13}C) mientras que la captación de este último prevalece en la fijación por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) ($PEP + HCO_3^- \rightarrow$ oxaloacetato + Pi), debido a la formación de HCO_3^- en la disolución del CO_2 atmosférico. La anhidrasa carbónica ($CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$) es también una enzima relevante para la comparación de las plantas C_3 con las C_4 . Múltiples isoformas fueron aisladas de tejidos foliares tanto en plantas C_3 como en plantas C_4 . En plantas C_3 , el estroma de los cloroplastos contiene la mayor parte de la actividad pero su rol fotosintético no está aclarado. En plantas C_4 , en cambio, la concentración de la anhidrasa carbónica en el citosol de las células del mesófilo sugiere que su actividad es esencial para desencadenar la vía C_4 . Para probar esta hipótesis Von Caemmerer *et al.* (2004) utilizaron una línea de *Flaveria bidentis* en cuyo genoma introdujeron una secuencia antisentido de la anhidrasa carbónica. El ritmo fotosintético de estas plantas transgénicas (C_4) mostró una caída pronunciada que contrastaba con líneas de tabaco (C_3) transformadas en forma similar (Price *et al.* 1994) en las cuales la disminución fue menor al 2%.

Hace 2.700 millones de años que la fotosíntesis es responsable de la vida sobre la tierra. El metabolismo C_3 prevaleció en la mayoría de los ecosistemas terrestres hasta la expansión de las plantas C_4 hace 5-8 millones de años (Mioceno tardío) (Osborne y Beerling, 2006). La fotosíntesis C_4 apareció en la biosfera cuando la concentración atmosférica de CO_2 disminuyó a niveles que limitaban la fotosíntesis, dominando actualmente las praderas y sabanas tropicales con una elevada contribución (25%) a la productividad primaria del planeta (Osborne y Beerling, 2006). Este mecanismo adaptativo opera como una bomba encargada de aumentar la concentración de CO_2 en la proximidad del centro activo de RUBISCO para favorecer la actividad carboxilasa. Aunque en la mayoría de las plantas C_4 la fotosíntesis se produce por la acción concertada de las células del mesófilo y las células de la vaina vascular, el dimorfismo celular no es una condición indispensable. Evidencias aportadas por Voznesenskaya *et al.*, (2001a) revelaron el funcionamiento de la fotosíntesis C_4 en una misma célula de *Borszczowia aralocaspica*, especie de la familia *Chenopodiaceae* que crece en las salinas deprimidas de los semidesiertos de Asia central.

Resulta sorprendente que el ritmo de aparición de las especies C_4 coincida cronológicamente con lugares tan distantes como el este de África, Pakistán y Norteamérica (Osborne y Beerling, 2006). Esta expansión casi sincronizada en la biosfera es congruente con la teoría de un disparador mundial como lo fue la declinación del contenido de CO_2 atmosférico (Ehleringer *et al.*, 1991; Cerling *et al.*, 1997). Aunque la fotosíntesis C_4 apareció inicialmente en las monocotiledóneas 24-35 millones de años atrás, las primeras dicotiledóneas con metabolismo C_4 , pertenecientes a la familia *Chenopodiaceae*, surgieron 15-21 millones de años atrás. La fotosíntesis C_4 predomina actualmente en tres familias de monocotiledóneas —*Poaceae*, *Cyperaceae* e *Hydrocharitaceae*— y en 16 familias de dicotiledóneas (considerando *Amaranteaceae* y *Chenopodiaceae* como familias independientes). El análisis filogenético revela que estas familias provienen de diferentes ancestros C_3 sugiriendo que las especies C_4 evolucionaron en forma independiente de distintos núcleos (Sage, 2004). Las variaciones en las características metabólicas pueden atribuirse a 45 orígenes independientes provenientes de 19 familias de plantas superiores, siendo uno de los ejemplos más asombrosos de evolución convergente en las plantas. Estudios recientes incorporan a este modelo reversiones de la fotosíntesis C_4 hacia la C_3 , identifica-

das durante la evolución de linajes que incluyen a la especie intermedia *Steinchisma bians* (*Poaceae*) (Duvall *et al.*, 2003).

Transición C_3 - C_4 en la evolución de la fotosíntesis C_4

El punto de compensación es la concentración de CO_2 en la atmósfera de una cámara cerrada cuando la fijación de CO_2 por fotosíntesis iguala a su liberación por fotorrespiración y respiración mitocondrial. Aunque los valores de las plantas C_4 (0-0,5 kPa CO_2) son generalmente menores que las contrapartes C_3 (4-5,5 kPa CO_2), numerosas especies presentan valores intermedios. A la primera identificada, *Mollugo verticillata* (Kennedy y Laetsch, 1974; Rawsthorne, 1992), siguieron más de 20 especies agrupadas en 10 géneros (cuatro de monocotiledóneas y seis de dicotiledóneas) (McKown *et al.*, 2005). En los últimos años los estudios de las especies C_3 - C_4 permitieron caracterizar las fases importantes en la evolución de las plantas C_4 , y condujeron a numerosos modelos sobre la secuencia de eventos en la transformación. A partir de los modelos sobre el proceso evolutivo de las plantas C_4 , Sage (2004) propuso *siete fases* distintivas en las cuales la inclusión de especies actuales en alguna de ellas indicaría una evolución no completada. Según este autor la *primera fase* produjo el acondicionamiento general de los genotipos para originar los focos de evolución casi simultáneamente en todo el globo. El múltiple origen de la vía C_4 en algunas familias de angiospermas sugiere que ciertas especies desarrollaron características que las tornaron predisuestas para evolucionar hacia el metabolismo C_4 . Dentro de los múltiples rasgos para esta predisposición sobresale la creación y el mantenimiento de un gran número de genes duplicados que permitió la aparición de mutaciones sin afectar la funcionalidad de la planta pero suministrando ventajas adaptativas (Monson, 2003). La *segunda fase* desarrolló una disposición anatómica tendiente a disminuir la distancia entre las células del mesófilo y las de la vaina celular facilitando en consecuencia la difusión rápida de los metabolitos. La mayor presencia del metabolismo C_4 en las gramíneas relativa a las dicotiledóneas sugiere que esta distancia en las plantas con los elementos de conducción paralelos sería menor que en las especies con una disposición reticulada. Dado que las células de la vaina vascular en las plantas C_3 presentan pocos

cloroplastos y mitocondrias, la *tercera fase* implicó un aumento de la proporción de las organelas en dicha localización. A este grupo pertenecerían las plantas C_3 que presentan una anatomía tipo Kranz. Una vez que el número de cloroplastos aumentó, el procesamiento de la glicina producida por la fotorrespiración dentro de las células de la vaina constituyó la nueva ventaja adaptativa. Dentro de la *cuarta fase*, la pérdida de la glicina descarboxilasa en el mesófilo impulsó la metabolización del aminoácido con la consecuente liberación del CO_2 en las células de la vaina, como ocurre en la especie *Moricandia arvensis*. La *quinta fase* estuvo caracterizada por mayores niveles de la PEP carboxilasa en el mesófilo incrementando la captación del CO_2 producido por la glicina descarboxilasa en la vaina vascular. Este proceso impide la liberación CO_2 a la atmósfera y, en consecuencia, conduce a la ausencia de una fotorrespiración detectable. El género *Flaveria* constituiría un ejemplo viviente de esta fase porque presenta no sólo tanto plantas C_3 como C_4 típicas sino también numerosos estados intermedios. Congruente con esta característica, la actividad PEP carboxilasa de las plantas C_3 es 40, 20 y 5 veces menor que las especies C_4 típicas, *F. linearis* y *F. brownii* (intermedias C_3 - C_4), respectivamente. (Monson y Moore 1989). En este contexto, el requerimiento adicional sería el aumento de las enzimas que reponen el PEP en el metabolismo C_4 . Probablemente, la piruvato diquinasa (Piruvato + ATP + Pi \rightarrow PEP + AMP + PPi) asumió el papel principal en la regeneración del PEP cuando la PEP carboxilasa predominó en el mesófilo (Monson y Moore, 1989). La integración de los ciclos C_3 y C_4 en la *sexta fase* requirió la expresión coordinada de las enzimas del mesófilo encargadas de (a) fijar el CO_2 (anhidrasa carbónica y PEP carboxilasa), (b) movilizar el carbono fijado y liberarlo en los cloroplastos de las células de la vaina (malato deshidrogenasa y enzima málica) y, (c) regenerar el PEP (piruvato diquinasa) y el ATP (adenilato quinasa). Es destacable que, a diferencia del impreciso papel que llevaría a cabo en plantas C_3 , el aumento de la actividad anhidrasa carbónica en el mesófilo de las plantas C_4 juega un rol importante en la transformación del CO_2 atmosférico en HCO_3^- , sustrato de la PEP carboxilasa. En línea con el aumento de la expresión de las enzimas de la vía C_4 , la actividad de RUBISCO cayó simultáneamente a niveles despreciables en las células del mesófilo. En la *séptima (última) fase*, el metabolismo C_4 optimizó no sólo las concentraciones de los diferentes metabolitos sino tam-

bién los mecanismos de regulación enzimática, haciendo más eficiente el proceso fotosintético. Ilustrativa en este aspecto es la enzima málica dependiente de NADP (NADP-ME) cuyas isoformas en plantas C_4 poseen mayor actividad específica y menor K_m que sus ancestros C_3 (Drincovich *et al.* 2001) mientras que la especie intermedia *Flaveria floridana* exhibe valores que se ubican entre las contrapartes de C_3 y C_4 (Casati *et al.*, 1999).

Aspectos estructurales

El metabolismo C_4 representa un claro ejemplo de compartimentalización en plantas (Hatch, 1987; Lunn, 2007). El esquema clásico implica la fijación inicial del CO_2 en el citosol de las células del mesófilo por el fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción catalizada por la PEP carboxilasa. El oxalacetato, producto de esta reacción, es reducido a malato por la malato deshidrogenasa (Oxaloacetato + NADPH + H^+ → malato + NADP⁺) o bien transaminado a aspartato por la aspartato amino transferasa (Oxaloacetato + glutamato → aspartato + 2-oxoglutarato). Estos dos productos de cuatro carbonos, malato y aspartato, son transportados vía plasmodesmos a las células de la vaina vascular para ser transformados en compuestos de tres carbonos por la liberación de CO_2 . En esta etapa, la descarboxilación exhibe no sólo diferentes reacciones sino también diferente localización intracelular. En los cloroplastos de las células de la vaina, la ribulosa-1,5-bisfosfato asimila el CO_2 liberado mediante la acción de RUBISCO y el 3-fosfoglicerato producido procede a compuestos orgánicos vía el ciclo de Benson-Calvin. PEP carboxilasa y RUBISCO están localizadas en las células del mesófilo y de la vaina, respectivamente, mientras que las descarboxilasas residen en diferentes compartimentos intracelulares de las células de la vaina: NADP-ME en los cloroplastos y NAD-ME en las mitocondrias (Malato + NAD(P)⁺ → piruvato + CO_2 + NAD(P)H + H^+) y la PEP carboxiquinasa en el citosol (Oxaloacetato + ATP → PEP + CO_2 + ADP). Los productos de la descarboxilación (piruvato, alanina, PEP) son transportados a las células del mesófilo para restituir el sustrato de una nueva carboxilación vía la PEP carboxilasa. El dimorfismo celular en las plantas C_4 también causa la partición de los productos de la asimilación fotosintética de CO_2 . La síntesis de sacarosa, lípidos tetrapirroles e isoprenoides está localizada

preferencialmente en las células del mesófilo, al igual que la asimilación del nitrógeno, mientras que la síntesis de almidón y la asimilación del azufre son llevadas a cabo en las células de la vaina vascular (Lunn y Furbank, 1997; Majeran *et al.*, 2005; Lunn, 2007).

Por muchos años la fotosíntesis C_4 estuvo ligada conceptualmente a la anatomía Kranz. Sin embargo, el hallazgo de la especie *Borszczowia aralocaspica* demostró que el metabolismo C_4 no requiere estrictamente el dimorfismo celular. *Chenopodiaceae*, la familia que posee el mayor número de especies C_4 entre las dicotiledóneas, presenta diferentes características, incluyendo cinco variantes de anatomía Kranz y dos de bioquímica C_4 (Voznesenskaya *et al.*, 2001a). La comparación de la anatomía foliar de *B. aralocaspica* con otras dos quenopodiáceas: —*Salsola laricina* y *Suaeda heterophylla*— reveló notables diferencias. *S. laricina* exhibe una vaina vascular central rodeada de un parénquima acumulador de agua, y una anatomía Kranz con una distintiva capa periférica de células en empalizada conteniendo cloroplastos con pocas granas y sin almidón, y células Kranz que poseen cloroplastos con muchas granas y almidón. En cambio, *B. aralocaspica* muestra una capa de células de clorénquima en forma de empalizada localizada entre el tejido central de reserva de agua y las células de la hipodermis. Estas células de clorénquima radialmente elongadas poseen una vacuola central y una capa de citoplasma periférico con pocos cloroplastos en la parte distal (con respecto a la vaina vascular) de las células y una alta densidad de citoplasma, numerosos cloroplastos y grandes mitocondrias en la zona proximal. La grana y el contenido de almidón escasean en la región distal pero abundan en la región proximal. En cambio, los espacios de aire aparecen entre las células de la región distal pero son inexistentes en la zona proximal. En resumen, *B. aralocaspica* presenta dimorfismo cloroplastídico en una misma célula cuyo funcionamiento sustituiría el dimorfismo celular clásico de la anatomía Kranz, observable en *S. laricina*. En este contexto, *Su. heterophylla*, especie C_3 perteneciente a la subfamilia *Salsoloideae*, carece de anatomía Kranz y exhibe dos a tres capas de grandes células mesofílicas en empalizada que contienen una gran vacuola central y una delgada lámina de cloroplastos en la periferia de las células, disposición común en células de plantas C_3 . Los estudios bioquímicos complementarios en *B. aralocaspica* revelaron que la distribución intracelular en dos compartimentos perfectamente definidos, no sólo de las organelas sino también de las enzimas, contribuye a

eleva la concentración de CO_2 en las cercanías de RUBISCO.

B. aralocaspica presenta similitud con las plantas C_4 en la respuesta de la asimilación fotosintética de CO_2 frente a concentraciones variables del O_2 atmosférico y en la discriminación isotópica del carbono. Además, congruente con el transporte de compuestos de cuatro carbonos hacia los sitios de asimilación y de tres carbonos hacia los sitios de fijación de CO_2 atmosférico, la RUBISCO y la NAD-ME están concentradas en la región proximal de las células, mientras que la PEP carboxilasa y la piruvato fosfato diquinasa son abundantes la región distal. Aunque contienen RUBISCO en los escasos y pequeños cloroplastos, las células que reservan el agua y de la hipodermis no participan directamente en el proceso fotosintético porque carecen de las enzimas características de la vía C_4 .

Un aporte diferente pero significativo para la comprensión de la evolución de las plantas C_4 , fue el descubrimiento de elevadas actividades de las enzimas asociadas al metabolismo C_4 en las células que circundan al xilema y floema de las plantas C_3 (e.g., tabaco) y, además, la utilización del carbono suministrado como por el sistema vascular (Hibberd y Quick (2002)).

En conjunto, los hallazgos de Voznesenskaya *et al.* (2001a) y Hibberd y Quick (2002) sugieren que las transformaciones bioquímicas precedieron a los cambios anatómicos en la evolución de la fotosíntesis C_4 , por las cuales un grupo mayoritario de especies evolucionó hacia la anatomía Kranz mientras que otras desarrollaron estructuras diferentes manteniendo la funcionalidad.

Aspectos ecológicos

El funcionamiento de la fotosíntesis C_4 requiere la acción concertada de procesos metabólicos y fisiológicos. En consecuencia, las plantas C_4 podrían carecer de la habilidad observable en las plantas C_3 para tolerar bajas irradiancias, temperaturas variables, o elevadas concentraciones de CO_2 . Una falla en la coordinación funcional y estructural entre las células del mesófilo y de la vaina vascular puede llevar a una disminución en la eficiencia fotosintética (Sage y McKown, 2006). Aunque una disminución en la actividad de RUBISCO surge luego de un período prolongado a elevadas concentraciones de CO_2 , las plantas C_3 muestran una mayor capacidad para la aclimatación que las C_4 (Long

et al., 2004). Las plantas C_4 , en cambio, no evidencian respuestas de este tipo, tal vez porque sus mecanismos intrínsecos obligan a RUBISCO y otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin a operar en condiciones de elevadas concentraciones de CO_2 (Sage y Kubien, 2003). En general, las plantas C_4 poseen una distribución ecológica y biogeográfica más restringida que las C_3 , predominando en las zonas áridas y salinas del planeta (Sage y McKown, 2006). Tal vez, el metabolismo C_4 constituya una forma de aclimatación de las especies C_3 expuestas a perturbaciones ambientales durante plazos largos. Congruente con esta idea, la especie *Hedysaron fruticosum* una planta C_3 de zonas áridas del norte de China (Niu *et al.*, 2006) cuya discriminación isotópica del carbono y anatomía foliar la sitúan entre las plantas C_3 exhibe en ambientes desfavorables tasas fotosintéticas, usos del agua y actividades enzimáticas similares a las plantas C_4 . Otras especies C_3 en condiciones de estrés también desarrollan un metabolismo C_4 . Aunque no exhibe una anatomía Kranz, *Hydrilla verticillata* (*Hydrocharitaceae*) responde como una planta C_4 cuando la presión parcial de CO_2 disminuye críticamente por anegamiento mientras que la especie anfibia *Eleocharis vivipara* (*Cyperaceae*) sumergida se comporta como una planta C_3 pero adquiere un metabolismo C_4 , con anatomía Kranz incluida, al adaptarse a una vida terrestre (Reiskind *et al.*, 1997; Ueno, 2001). Si estas especies deben ser consideradas intermedias C_3 - C_4 es terreno de discusión.

Aspectos metabólicos

Inicialmente, el punto de compensación caracterizaba las especies intermedias C_3 - C_4 pero actualmente las bases metabólicas definen dicho comportamiento. Numerosas evidencias sugieren que las especies intermedias C_3 - C_4 de los géneros *Alternanthera*, *Moricandia*, *Panicum* y *Parthenium* no poseen un metabolismo C_4 que justifique sus bajas tasas de fotorrespiración. En las especies mencionadas, el CO_2 no es transferido al ciclo de Benson-Calvin utilizando intermediarios de cuatro carbonos y las actividades de las enzimas del ciclo C_4 son bajas (Rawsthorne, 1992). Una de las enzimas claves del metabolismo C_4 , la PEP carboxilasa, representaría un ejemplo de las modificaciones moleculares y funcionales que acompañan los cambios anatómicos y fisiológicos en la evolución C_3 - C_4 . La carboxilación irreversible del PEP mediante el HCO_3^- diferencia a la PEP

carboxilasa de las carboxilasas que reconocen al CO_2 como sustrato (e.g. RUBISCO). La PEP carboxilasa, tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas (ca. 100 kDa), cumple importantes funciones en órganos no fotosintéticos mediante reacciones anapleróticas que suministran los metabolitos al ciclo de Krebs en las primeras fases de la evolución C_4 . Estas características metabólicas confluyen a postular que los ancestros C_3 estuvieron predispuestos para duplicar los genes dando la posibilidad de mantener las mutaciones sin afectar la fisiología del organismo. Si bien, la duplicación génica pudo originar los componentes de la vía C_4 actual (Sage, 2004), un metabolismo eficiente requirió alteraciones en los patrones de expresión de los genes involucrados, principalmente a nivel del promotor (Svensson *et al.*, 2003). La isoforma fotosintética de la PEP carboxilasa se expresa solamente en las células del mesófilo mientras que los ortólogos no fotosintéticos se expresan en todos los órganos y tejidos. Por otra parte, las actividades que la enzima exhibe en el género *Flaveria* guardan estrecha relación con las características estructurales y fotosintéticas de la planta (Tabla 1).

La evolución de especies C_4 a partir de ancestros C_3 , tal como hoy se sostiene, llevó una considerable cantidad de años pero el advenimiento de la ingeniería genética introduce al hombre como un nuevo factor en esta conversión. Dos objetivos primaron en los intentos para aumentar la eficiencia fotosintética: la disminución de la fotorrespiración y la incorporación de mecanismos para aumentar la concentración de CO_2 en las proximidades de RUBISCO (Raines, 2006). En general, la inactivación de los genes que codifican para las enzimas de la vía fotorrespiratoria arrojó resultados negativos, cuando no letales (Raines, 2006). Aunque se han obtenido resultados interesantes con la incorpora-

ción de genes propios del metabolismo C_4 a plantas C_3 , no se han comprobado alteraciones significativas en el metabolismo de la planta receptora (Tabla 2). Un aspecto importante es que el mecanismo de concentración del CO_2 en la mayoría de las especies C_4 depende de la separación espacial entre la fijación del CO_2 atmosférico y su asimilación por el ciclo de Benson-Calvin. Aunque la fotosíntesis C_4 no depende de una anatomía Kranz (Voznesenskaya *et al.*, 2001a), la evolución hacia dicho camino metabólico requiere la modificación anatómica que favorezca el mecanismo de acumulación de CO_2 (Sage, 2004). Los intentos para sobreexpresar genes del metabolismo C_4 en plantas C_3 crearon un sistema basado en el funcionamiento intracelular sin tener en cuenta la adaptación anatómica, quizás por la ausencia de técnicas adecuadas para tal fin. Aunque el descubrimiento de metabolismo C_4 monocelular permitiría obviar el dimorfismo celular (Reiskind *et al.*, 1997; Voznesenskaya *et al.*, 2001a, 2003) *B. aralocaspica* exhibe un ordenamiento subcelular que separa topográficamente la fijación del CO_2 via PEP carboxilasa de la asimilación via RUBISCO. No sólo los aspectos anatómicos sino también los metabólicos (e.g. sobreexpresión de la anhidrasa carbónica, coexpresión simultánea de genes) deben ser incluidos en el diseño de las futuras líneas transgénicas (Raines, 2006).

Por otra parte, son destacables las alternativas experimentales que intentan aumentar la eficiencia fotosintética incrementando la disponibilidad de CO_2 en las cercanías de RUBISCO mientras mantienen la estructura de planta C_3 . Extremadamente interesante fue la transformación de tabaco (C_3) con un gen de cianobacterias implicado en acumular intracelularmente CO_2 (Lieman-Hurwitz *et al.*, 2003). Estas nuevas

TABLA 1
Evolución de la fotosíntesis C_4 en el género *Flaveria*
(Edwards *et al.*, 1987; Svensson *et al.*, 2003)

Parámetro	<i>F. pringley</i>	<i>F. linearis</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. brownii</i>	<i>F. trinervia</i>
Anatomía Kranz	No	Poco desarrollada	Poco desarrollada	Bien desarrollada	Bien desarrollada
Punto de compensación (μbar)	62	27	21	6	3
Actividad PEP carboxilasa ($\mu\text{mol.mg Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	24	123	207	460	900
Ciclo C_4	-	+	++	+++	++++
Tipo de fotosíntesis	C_3	$\text{C}_3\text{-C}_4$	$\text{C}_3\text{-C}_4$	tipo C_4	C_4

líneas exhiben un aumento en la tasa fotosintética a concentraciones limitantes de CO₂ pero no frente a concentración saturantes. Congruente con un aumento de la concentración de CO₂ en las proximidades de RUBISCO, el punto de compensación en las plantas transgénicas fue menor que la contraparte silvestre. En este contexto, RUBISCO activasa, enzima que estimula la actividad de RUBISCO, surge como potencial objeto de estudio en los enfoques para aumentar la eficiencia fotosintética (Salvuci *et al.*, 2001; Raines, 2006). El conjunto de estos resultados permite vislumbrar la aparición de una nueva generación de estados de transición C₃-C₄.

Metabolismo intermedio C₃-C₄

Aunque la secuenciación completa de los genomas de *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*) provee información valiosa sobre modelos de dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente, ambas especies exhiben fotosíntesis C₃. La reciente descripción del genoma completo de maíz, especie que podría constituirse como modelo para las C₄, abre nuevas y alentadoras expectativas.

La idea prevalente en los estudios evolutivos es que el metabolismo C₄ surgió simultáneamente en linajes separados espacialmente como respuesta a los cambios

TABLA 2
Impacto de la expresión de enzimas C₄ en plantas C₃ (Raines, 2006)

Enzima sobre-expresada	Planta receptora	Impacto sobre la fisiología	Impacto sobre el crecimiento	Referencia
PEP carboxilasa de maíz	Arroz	Aumento de la fotosíntesis bajo saturación lumínica. Disminución de la sensibilidad al O ₂ de la fijación de CO ₂	ND	Ku <i>et al.</i> (1999)
PEP carboxilasa de patata	Patata	El flujo de carbono cambia hacia aminoácidos. Estimulación de la NADP-malato deshidrogenasa endógena	Decoloración de hojas	Hausler <i>et al.</i> (2001)
Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Patata	Disminución en el contenido de piruvato, aumento en el de malato	ND	Ishimaru <i>et al.</i> (1998)
Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Arroz	Supresión de fotosíntesis Estimulación de la respiración Función estomática alterada	No visible fenotípicamente	Fukayama <i>et al.</i> (2002)
Piruvato ortofosfato diquinasa de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Tabaco	Sin efecto	Sin efectos	Sheriff <i>et al.</i> (1988)
NADP-malato deshidrogenasa de maíz	Arroz	Actividad NADP-malato deshidrogenasa 20 a 70 veces aumentada Cloroplastos anormales	Hojas atrofiadas y decoloradas	Takeuchi <i>et al.</i> (2000)
PEP carboxiquinasa de <i>Urochloa panicoides</i>	Arroz	Mayor flujo de CO ₂ hacia compuestos C ₄ Sin cambios en la fotosíntesis	Sin efectos	Tsuchida <i>et al.</i> (2001) Suzuki <i>et al.</i> (2000)
PEP carboxiquinasa de <i>Urochloa panicoides</i>	Tabaco	Sin efectos	Sin efectos	Hausler <i>et al.</i> (2001)
PEP carboxilasa de <i>Corynebacterium</i> + NADP-malato deshidrogenasa de <i>Flaveria</i>	Patata	Inhibición por O ₂ atenuada	ND	Hausler <i>et al.</i> (1999)
PEP carboxilasa + Piruvato ortofosfato diquinasa de maíz	Arroz	Aumento de la capacidad fotosintética	Aumento del rendimiento de granos	Ku <i>et al.</i> (2001)

en las condiciones ambientales, fundamentalmente el descenso de la concentración atmosférica de CO₂. Esta separación filogenética generó un gran número de variantes que condujeron a la expresión del metabolismo C₄ en diferentes líneas. Esta característica y los escasos datos sobre los genomas de las especies cuyo metabolismo alterna entre las vías C₃ y C₄ constituyen una dificultad para sugerir un mecanismo general. Aunque existen géneros muy estudiados, e.g. *Flaveria*, éste no constituiría un modelo para otras especies porque no serían similares los caminos evolutivos y el desarrollo alcanzado. Por ello, la presente revisión describe ejemplos de plantas C₃-C₄ típicas para establecer el estado del conocimiento y, en consecuencia, vislumbrar las perspectivas de las líneas de investigación que se encaren en el futuro.

Alloteropsis

La especie *Alloteropsis semialata* (*Poaceae*) incluye subespecies tipo C₃ (ssp. *eckloniana*) y C₄ (ssp. *semialata*). La subespecie *eckloniana* exhibe una anatomía Kranz anómala en la cual las células del mestoma (la capa interna de la vaina vascular) poseen abundantes cloroplastos y mitocondrias. Las células del mesófilo y del mestoma acumulan RUBISCO y glicina descarboxilasa pero los niveles de enzimas C₄ son bajos. La anatomía Kranz de la subespecie *semialata* también es anómala pero contiene niveles elevados de las enzimas implicadas en el metabolismo C₄ dependiente de PEP carboxiquinasa. La PEP carboxilasa, la piruvato ortofosfato diquinasa y la glicina descarboxilasa particionan diferencialmente entre las células del mesófilo y las de la vaina vascular mientras que RUBISCO se encuentra en ambos tipos de células. Ambas subespecies de *Alloteropsis semialata* contendrían metabolismos intermedios con un uso potencial en los estudios sobre la evolución C₄ (Ueno y Sentoku, 2006).

Moricandia

Brassicaceae es una familia agrónomicamente importante que incluye numerosas especies hortícolas y oleaginosas. Aunque la mayoría de las especies poseen fotosíntesis C₃, los géneros *Moricandia*, *Diplotaxis* y *Brassica* exhiben la vía intermedia C₃-C₄ (Apel *et al.*, 1997). Dada la facilidad para implementar hibridiza-

ciones en esta familia, un trabajo reciente estudió los cruzamientos entre *Moricandia arvensis* (C₃-C₄) y *Brassica oleracea* (C₃) (Ueno *et al.*, 2007). Los puntos de compensación y las tasas fotosintéticas de los híbridos obtenidos exhibieron valores intermedios a las especies parentales. La transmisión de estos caracteres permite vislumbrar el aumento de la eficiencia fotosintética mediante la incorporación de rasgos C₄ en especies C₃, objetivo para el cual se ha propuesto utilizar el gen de glicina descarboxilasa de la especie intermedia (*Moricandia nitens* en este caso) como marcador selectivo (Zhang *et al.*, 2004).

Eleocharis

Como la especie *Hydrilla verticillata* (*Hydrocharitaceae*), que desarrolla fotosíntesis C₄ en condiciones de anegamiento (Rao *et al.*, 2006), otras especies acuáticas pertenecientes a los géneros *Neostaffia*, *Tuctoria* y *Orcuttia* (Tribu *Orcuttieae* - *Poaceae*) evolucionaron también hacia dicho metabolismo (Keeley, 1998). En cambio, la especie anfibia *Eleocharis vivipara* expresa características C₄ en vida terrestre y se comporta como C₃ cuando está sumergida. Aunque la expresión de genes C₄ no está vinculada al desarrollo de la anatomía Kranz (Uchino *et al.*, 1998), la forma terrestre exhibe bien desarrollada dicha morfología en su tallo (culm) con definidas características C₄, mientras que la forma acuática no conserva el dimorfismo celular y expresa bioquímicamente la fotosíntesis C₃. La transición de la forma C₄ a la C₃ procede gradualmente cuando las plantas terrestres son sumergidas pero el cambio inverso ocurre comparativamente más rápido cuando plantas acuáticas son transferidas al aire (Agarie *et al.*, 2002). Notablemente, la adición del ácido abscísico al agua induce la formación de nuevos tallos con anatomía Kranz y metabolismo C₄ en las plantas sumergidas sugiriendo la participación de esta hormona en la implementación de esta vía fotosintética (Ueno, 1998).

Flaveria

El género *Flaveria*, perteneciente a la familia *Asteraceae*, ha recibido particular atención en los últimos años debido a la presencia de especies con diferentes estados de transición C₃-C₄. Aunque su utilización para el estudio del metabolismo C₄ fue relativizada (Brown

TABLA 3
Tipos fotosintéticos del género *Flaveria* (McKown *et al.*, 2005)

C_3	C_3 - C_4	tipo- C_4	C_4
<i>F. cronquistii</i>	<i>F. angustifolia</i>	<i>F. brownii</i>	<i>F. australasica</i>
<i>F. mcdougalli</i>	<i>F. anomala</i>	<i>F. haumanii</i> (o C_4)	<i>F. bidentis</i>
<i>F. pringley</i>	<i>F. chloraefolia</i>	<i>F. kochiana</i> (o C_4)	<i>F. campestris</i>
<i>F. robusta</i>	<i>F. floridana</i>	<i>F. palmeri</i>	<i>F. trinervia</i>
	<i>F. linearis</i>	<i>F. vaginata</i>	
	<i>F. oppositifolia</i>		
	<i>F. pubescens</i>		
	<i>F. ramosissima</i>		
	<i>F. sonorensis</i>		

et al., 2005), resulta interesante para seguir la evolución de (i) los mecanismos de concentración de CO_2 , (ii) la fotorrespiración (Ku *et al.*, 1991; McKown *et al.*, 2005), (iii) las actividades enzimáticas C_4 (Casati *et al.*, 1999; Westhoff y Gowik, 2004) y (iv) las transformaciones genéticas (Chu *et al.*, 1997). Este género posee 23 especies conocidas, de las cuales algunas son C_3 o C_4 (del tipo NADP-ME) estrictas y otras intermedias cuyos estados de transición han sido subclasificados en C_3 - C_4 intermedios o tipo- C_4 (Cheng *et al.*, 1988) (Tabla 3).

El estudio filogenético de McKown *et al.* (2005) demostró dos orígenes independientes que parten de ancestros C_3 para los estados intermedios (C_3 - C_4 ; tipo- C_4). Congruente con esta condición ancestral, las especies con fotosíntesis C_3 están restringidas a las porciones basales de la filogenia (Sage, 2004). Aunque el paradigma actual sostiene que las especies intermedias representan sobrevivientes que se encuentran en evolución hacia una fotosíntesis C_4 , algunos investigadores sugieren que ellas no tienen posibilidades de evolucionar más allá de su estado actual (Edwards y Ku, 1987; Monson y Moore, 1989; McKown *et al.*, 2005).

Salsola

El primer caso descrito de metabolismo intermedio C_3 - C_4 dentro de la familia *Chenopodiaceae* fue *Salsola arbusculiformis* (Voznesenskaya *et al.*, 2001b). El análisis de las especies pertenecientes a la tribu *Salsoleae* resulta sumamente interesante para entender la evolu-

ción de la fotosíntesis C_4 y los mecanismos de adaptación que las plantas ponen en juego frente a condiciones ambientales desfavorables. Los estudios fisiológicos indican que la mayoría de las especies del género *Salsola* presentan fotosíntesis C_4 , dependiente de la NADP-ME. La anatomía Kranz en este género está caracterizada por cloroplastos dimórficos pero difiere con el tipo de fotosíntesis C_4 . La grana de los cloroplastos de las células del mesófilo en las especies NADP-ME está mucho más desarrollada que en las células de la vaina vascular, mientras que la morfología plastídica en las especies NAD-ME es la inversa (Voznesenskaya *et al.*, 2003). Algunas especies dentro de la tribu *Salsoleae* (*Chenopodiaceae*) presentan una fotosíntesis C_3 en los cotiledones durante la embriogénesis y postgerminación pero desarrollan un metabolismo C_4 en hojas y tallos verdes (Voznesenskaya *et al.*, 1999). Las bases anatómicas y fisiológicas de esta transición se han identificado en *Salsola richteri* (Voznesenskaya *et al.*, 2003). Después de cinco días de crecimiento en presencia de luz, las hojas adquieren las características C_4 (compartimentalización de PEP carboxilasa y RUBISCO), y llegan al estado maduro con una anatomía Kranz totalmente desarrollada y una fotosíntesis C_4 enteramente funcional.

Conclusiones

El surgimiento de mecanismos para la utilización eficiente del carbono atmosférico y del H_2O facilitó la expansión de los vegetales en los medios inhóspitos.

Uno de estos mecanismos, la fotosíntesis C_4 , suministró a las plantas terrestres la tolerancia tanto a la disminución del CO_2 atmosférico y del H_2O como al aumento de la temperatura ambiental. Notables avances fueron logrados últimamente en los estudios de los genomas, las características bioquímicas, las estructuras anatómicas y los rasgos fisiológicos del metabolismo C_4 . Sin embargo, ciertas especies toleraron los ambientes tórridos y secos pero no progresaron en la adquisición de esta capacidad por las restricciones impuestas por su genoma. En este contexto, las plantas C_3 - C_4 constituyen «fósiles vivientes» cuyo estudio, concertadamente con las líneas transgénicas provistas por la ingeniería genética, es adecuado para dilucidar el camino seguido por las plantas C_4 durante la evolución. Pero más importante, la información provista por las plantas C_3 - C_4 aportará herramientas para un diseño racional de especies eficientes que no sólo toleren los cambios impuestos por la sociedad en el medio ambiente sino también utilicen los terrenos (semi)desérticos para una agricultura que satisfaga los requerimientos alimenticios y energéticos futuros.

Referencias bibliográficas

- AGARIE, S.; KAI, M.; TAKATSUJI, H.; UENO, O. (2002). «Environmental and hormonal regulation of gene expression of C_4 photosynthetic enzymes in the amphibious sedge». *Eleocharis vivipara*. *Plant Science*, 163, 571-580.
- APEL, P.; HORTSMAN, G.; PFIFFER, M., (1997). «The *Morinda* syndrome in species of the *Brassicaceae*: evolutionary aspects». *Photosynthetica*, 33, 205-215.
- BROWN, J. B.; PARSELY, K.; HIBBERD, J. M. (2005). «The future of C_4 research - maize, *Flaveria* or *Cleome*?». *Trends in Plant Science* 10(5), 215-221.
- CASATI, P.; FRESCO, A. G.; ANDREO, C. S.; DRINCOVICH, M. F. (1999). «An intermediate form of NADP-malic enzyme from the C_3 - C_4 intermediate species». *Flaveria floridana*. *Plant Science*, 147, 101-109.
- CERLING, T. E.; HARRIS, J. M.; MACFADEN, B. J.; LEAKEY, M. G.; QUADE, J.; EISENMANN, V.; EHLERINGER, J. R. (1997). «Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary». *Nature*, 389, 153-158.
- CHENG, S.; MOORE, B.; EDWARDS, G. E.; KU, M. (1988). «Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a C_4 -like species». *Plant Physiology*, 87, 867-873.
- CHU, C.; QU, N.; BASSÜNER, B.; BAUWE, H. (1997). «Genetic transformation of the C_3 - C_4 intermediate plant, *Flaveria pubescens* (Asteraceae)». *Plant Cell Reports*, 16, 715-718.
- DRINCOVICH, M. F.; CASATI, P.; ANDREO, C. S. (2001). «NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways». *FEBS Letters*, 490, 1-6.
- DUVALL, M. R.; SAAR, D. E.; GRAYBURN, W. S.; HOLBROOK, G. P. (2003). «Complex transitions between C_3 and C_4 photosynthesis during the evolution of Paniceae: A phylogenetic case study emphasizing the position of *Steinchisma hians* (Poaceae), a C_3 - C_4 intermediate». *International Journal of Plant Science*, 164, 949-958.
- EDWARDS, G. E.; KU, M. S. B. (1987). En: *The Biochemistry of Plants*. Ed. M. D. Hatch, N. K. Boardman. Academic Press (New York), 275-325.
- EHLERINGER, J. R.; SAGE, R. F.; FLANAGAN, L. B.; PEARCY, R. W. (1991). «Climate change and the evolution of C_4 ». *Tree*, 6, 95-99.
- FUKUYAMA, H.; TAMAI, T.; TSUCHIDA, H.; MIYAO-TOKUTOMI, M. (2002). «Overproduction of the maize C_4 -specific PEPC enhances the respiration under illumination in transgenic rice plants». *Plant and Cell Physiology*, 43, 173-173.
- HATCH, M. D. (1987). « C_4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure». *Biochimica et Biophysica Acta*, 895, 81-106.
- HAUSLER, R. E.; RADEMACHER, T.; LI, J.; LIPKA, V.; FISCHER, K. L.; SCHUBERT, S.; KREUZALER, F.; HIRSCH, H. J. (2001). «Single and double overexpression of C_4 -cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants». *Journal of Experimental Botany*, 52, 1785-1803.
- HAUSLER, R. E.; KLEINES, M.; UHRIG, H.; HIRSCH, H. J.; SMETS, H. (1999). «Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the CO_2 compensation point (γ^*) and enhances dark and light respiration in transgenic potato». *Journal of Experimental Botany*, 50, 1231-1242.
- HIBBERD, J. M.; QUICK, W. P. (2002). «Characteristics of C_4 photosynthesis in stems and petioles of C_3 flowering plants». *Nature*, 415, 451-454.
- ISHIMARU, K.; OHKAWA, Y.; ISHIGE, T.; TOBIAS, D. J.; OHSUGI, R. (1998). «Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C_3 transgenic potato with a C_4 maize PPDK gene». *Physiologia Plantarum*, 103, 340-346.
- KEELEY, J. E. (1998). « C_4 photosynthetic modifications in the evolutionary transition from land to water in aquatic grasses». *Oecologia*, 116, 85-97.
- KEELEY, J. E.; RUNDEL, P. W. (2003). «Evolution of CAM and C_4 carbon-concentrating mechanisms». *International Journal of Plant Science*, 194, 555-577.
- KENNEDY, R. A.; LAESTCH, W. M. (1974). «Plant species intermediate for C_3 , C_4 photosynthesis». *Science*, 184, 1087-1089.
- KU, M. S. B.; CHO, D. H.; LI, X.; JIAO, D. M.; PINTO, M.; MIYAO, M.; MATSUOKA, M. (2001). «Introduction of genes encoding C_4 photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences». In *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality* (eds. J.A. Goode & D.C. Chadwich), pp. 100-116. John Wiley & Sons, NY, USA.
- KU, M.; WU, J.; DAI, Z.; SCOTT, R. A.; CHU, C.; EDWARDS, G. (1991). «Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species». *Plant Physiology*, 96, 518-528.
- LIEMAN-HURWITZ, J.; RACHMILEVITCH, S.; MITTLER, R.; MARCUS, Y.; KAPLAN, A. (2003). «Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express *ictB*, a gene involved in HCO_3^- accumulation in cyanobacteria». *Plant Biotechnology J*, 1, 43-50.
- LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; ORT, D. R.

- (2004). «Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future». *Annual Review of Plant Biology*, 55, 591-628.
- LUNN, J. E. (2007). «Compartmentation in plant metabolism». *Journal of Experimental Botany*, 56, 35-47.
- LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. (1997). «Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C₄ plants». *Planta*, 202, 106-111.
- MAJERAN, W.; CAI, Y.; SUN, Q.; VAN WIJK, K. J. (2005). «Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics». *The Plant Cell*, 17, 3111-3140.
- MCKOWN, A. D.; MONCALVO, J. M.; DENGLER, N. (2005). «Phylogenia of *Flaveria* (Asteraceae) and inference of C₄ photosynthesis evolution». *American Journal of Botany*, 92, 1911-1928.
- MONSON, R. K.; MOORE, B. D. (1989). «On the significance of C₃ - C₄ intermediate photosynthesis to the evolution of C₄ photosynthesis». *Plant, Cell and Environment*, 12, 689-699.
- MONSON, R. K. (2003). «Gene duplication, neofunctionalization, and the evolution of C₄ photosynthesis». *International Journal of Plant Science*, 164, S43-S54.
- NIU, S.; JIANG, G.; WAN, S.; LI, Y.; GAO, L.; LIU, M. (2006). «A sand-fixing pioneer C₃ species in sadland displays characteristics of C₄ metabolism». *Environmental and Experimental Botany*, 57, 123-130.
- OSBORNE, C. P.; BEERLING, D. J. (2006). «Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C₄ plants». *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 3, 61, 173-194.
- PRICE, G. D.; VON CAEMMERER, S.; EVANS, J. R.; YU, J.-W.; LLOYD, J.; OJA, V.; KELL, P.; HARRISON, K.; GALLAGHER, A.; BADGER, M. R. (1994). «Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation». *Planta*, 193, 331-340.
- RAINES, C.A. (2006). «Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C₃ carbon fixation cycle». *Plant, Cell and Environment*, 29, 331-339.
- RAO, S. K.; FUKUYAMA, H.; REISKIND, J. B.; MIYAO, M.; BOWES, G. (2006). «Identification of C₄ responsive genes in the facultative C₄ plant *Hydrilla verticillata*». *Photosynthesis Research*, 88, 173-183.
- RAWSTHORNE, S. (1992). «C₃-C₄ intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression». *The Plant Journal* 2, 267-274.
- REISKIND, J. B.; MADSEN, T. V.; VAN GINKEL, L. C.; BOWES, G. (1997). «Evidence that inducible C₄-type photosynthesis is chloroplastic CO₂-concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot». *Plant, Cell and Environment*, 20, 211-220.
- SAGE, R. F.; KUBIEN, D. S. (2003). «*Quo vadis* C₄? An ecophysiological perspective on global change and the future of C₄ plants». *Photosynthesis Research*, 77, 209-225.
- SAGE, R. F.; MCKOWN, A. D. (2006). «Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis?» *Journal of Experimental Botany*, 57, 303-317.
- SAGE, R. F. (2004). «The evolution of C₄ photosynthesis». *New Phytologist*, 161, 341-370.
- SALVUCCI, M. E.; OSTERYOUNG, K.W.; CRAFTS-BRANDNER, S.J.; VIERLING, E. (2001). «Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo*». *Plant Physiology* 127, 1053-1064.
- SCHNABEL, S. P.; WARE, D.; FULTON, R. S. *et al.* 2009. «El genoma del maíz B73: complejidad, diversidad y dinámica». *Science* 326, 1112-1115.
- SHERIFF, A.; MEYER, H.; RIEDEL, E.; SCHMITT, J. M.; LAPKE, C. (1998). «The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C-3 plant with respect to the intracellular location of the enzyme». *Plant Science*, 136, 43-57.
- SUZUKI, S.; MURAI, N.; BURNELL, J. N.; ARAI, M. (2000). «Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C₄-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Urochloa panicoides*». *Plant Physiology*, 124, 163-172.
- SVENSSON, P.; BLÄSING, O. E.; WESTHOFF, P. (2003). «Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414, 180-188.
- TAKEUCHI, K.; AKAGI, H.; KAMASAWA, N.; OSUMI, M.; HONDA, H. (2000). «Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme». *Planta*, 211, 265-274.
- TSUCHIDA, H.; TAMAI, T.; FUKUYAMA, H.; AAGARIE, S.; NOMURA, M.; ONODERA, H.; ONO, K.; NISHIZAEA, Y.; LEE, B.-H.; HIROSE, S.; TOKI, S.; KU, M. S. B.; MATSUOKA, M.; MIYAO, M. (2001). «High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C₃ plant, rice». *Plant and Cell Physiology*, 42, 138-145.
- UCHINO, A.; SENTOKU, N.; NEMOTO, K.; IISHII, R.; SAMEJIMA, M.; MATSUOKA, M. (1998). «C₄-type gene expression is not directly dependent on Kranz anatomy in an amphibious sedge *Eleocharis vivipara* Link». *The Plant Journal*, 14, 565-572.
- UENO, O.; SENTOKU, N. (2006). «Comparison of leaf structure and photosynthetic characteristics of C₃ and C₄ *Alloteropsis semialata* subspecies». *Plant, Cell and Environment*, 29, 257-268.
- UENO, O. (1998). «Induction of Kranz anatomy and C₄-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid». *The Plant Cell*, 10, 571-583.
- (2001). «Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*». *Plant Physiology*, 127, 1524-1532.
- UENO, O.; BANG, S. W.; WADA, Y.; KOBAYASHI, N.; KANEKO, R.; KANEKO, Y.; MATSUZAWA, Y. (2007). «Inheritance of C₃-C₄ intermediate photosynthesis in reciprocal hybrids between *Moricandia arvensis* (C₃-C₄) and *Brassica oleracea* (C₃) that differ in their genome constitution». *Plant Production Science*, 10, 68-79.
- VON CAEMMERER, S.; QUINN, V.; HANCOCK, N.C.; PRICE, G. D.; FURBANK, R.T.; LUDWIG, M. (2004). «Carbonic anhydrase and C₄ photosynthesis: a transgenic analysis». *Plant, Cell and Environment*, 27, 697-703.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; ARTYUSHEVA, E. G.; FRANCESCHI, V. R.; PYANKOV, V. I.; KIIRATS, O.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. (2001b). «*Salsola arbusculiformis*, a C₃-C₄ intermediate in *Salsola* (Chenopodiaceae)». *Annals of Botany*, 88, 337-348.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; ARTYUSHEVA, E. G.; BLACK, C. C.; OYANKOV, V. I.; EDWARDS, G. E. (2003). «Development of the C₄ photosynthetic apparatus in cotyledons and leaves of *Salsola richteri* (Quenopodiaceae)». *International Journal of Plant Science*, 164, 471-487.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; KIIRATS, O.; FREITAG, H.; EDWARDS, G. E. (2001a). «Kranz anatomy is not

- essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis». *Nature*, 414, 543-546.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; PYANKOV, V. I.; EDWARDS, G. E. (1999). «Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe *Salsoleae* (*Chenopodiaceae*)». *Journal of Experimental Botany*, 50, 1779-1795.
- WESTHOFF, P.; GOWIK, U. (2004). «Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria*». *Annals of Botany*, 93, 13-23.
- ZHANG, C.; XU, G.; HUANG, R.; CHEN, C.; MENG, J. (2004). «A dominant *gdcP*-specific marker derived from *Moricandia nitens* used for introducing the C₃-C₄ character from *M. nitens* into *Brassica* crops». *Plant Breeding*, 123, 438-443.