

Fotosíntesis en plantas acuáticas Mecanismos de concentración del CO₂ en especies sumergidas acuáticas

MARÍA VALERIA LARA

CARLOS SANTIAGO ANDREO

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI)

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Suipacha 531 – 2000 Rosario –Argentina

candreo@fbioyf.unr.edu.ar

Publicación: maio de 2008.

INTRODUCCIÓN

Las especies macrófitas acuáticas sumergidas comprenden a un grupo variado e interesante de fotótrofos. Entre ellas se incluyen las plantas no vasculares como por ejemplo las algas macroscópicas y las briófitas; las plantas vasculares primitivas, como helechos y especies afines, y las plantas vasculares más evolucionadas, las angiospermas. Dentro de tan variado grupo de organismos existe una gran diversidad en la bioquímica y la fisiología del mecanismo de fijación fotosintética del carbono. A pesar de la presencia de mecanismos fotosintéticos similares a los presentes en plantas terrestres,

In: Prado, CHBA; Casali, CA. Fisiología Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri, editora Manole, 2006. ISBN: 85.204.1553-9. www.manole.com.br/ fisiologiavegetal

la clasificación de estas vías en las macrófitas acuáticas sumergidas es más compleja.

La disponibilidad de carbono inorgánico para la fotosíntesis difiere considerablemente en el aire y en el agua. El suministro de las especies químicas de carbono inorgánico disueltas en agua puede ser limitante para dicho metabolismo y para el crecimiento debido a la alta resistencia a la difusión en el agua (Madsen y Jensen, 1991). El CO_2 difunde 10.000 veces más lentamente en el agua que en el aire. Dos formas del carbono inorgánico, CO_2 y HCO_3^- , están potencialmente disponibles para la fotosíntesis en el agua. En la mayoría de los sistemas el HCO_3^- es la forma dominante¹. La concentración de las dos formas varía enormemente en diferentes sitios, y también puede ser modificada temporalmente y espacialmente dentro de un sitio como resultado de los procesos opuestos de fotosíntesis y respiración, modificados por intercambios atmosféricos, sedimentarios e hidrológicos (Madsen et al., 1996). Así, la concentración del CO_2 – sustrato de la RuBisCO – es baja en sistemas acuáticos. De esta manera, los autótrofos acuáticos han desarrollado diferentes estrategias para superar el problema de la limitación del CO_2 y de las altas concentraciones de O_2 que, al ser incorporado, conduce a la fotorrespiración con la concomitante pérdida del CO_2 fijado (Bowes y Salvucci, 1989). Estas estrategias incluyen diferentes mecanismos de concentración de CO_2 (CCM)²

¹La proporción de CO_2 y de HCO_3^- depende del pH. Por ejemplo, a pH 8,0 en aguas frescas suelen encontrarse concentraciones de 0,975 mM de HCO_3^- y 25 mM de CO_2 . A pH 7,0 las concentraciones habituales son de 0,800 mM y 0,200 mM, para HCO_3^- y CO_2 , respectivamente.

²CCM del Inglés CO_2 Concentrating Mechanism. Por definición un mecanismo de concentración de CO_2 es un proceso activo por el cual se aumenta en el sitio de la RuBisCO la concentración del CO_2 , y no del HCO_3^- , por encima de la

y la habilidad para utilizar HCO_3^- en la fotosíntesis (Raven, 1970; Bowes y Salvucci, 1989).

Las macrófitas acuáticas sumergidas exhiben características únicas que están relacionadas con su medio ambiente tales como bajas tasas fotosintéticas (Van y Haller, 1976), bajos requerimientos de luz, muy altos valores de K_m ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) (Maberly 1985) y el requerimiento de altos niveles de CO_2 para saturar la fotosíntesis (Raven, 1970; Marbely, 1985; Madsen y Jensen, 1991).³ La carac-

del medio circundante. La forma inorgánica del carbono es importante porque el CO_2 y no el HCO_3^- , es el sustrato de la RuBisCO que compete con el O_2 en el estroma cloroplástico. Las opciones de CCMs para plantas terrestres incluyen la toma de CO_2 a través del ciclo C_4 en plantas con fotosíntesis C_4 o con el metabolismo ácido de las crassuláceas (CAM). Las especies acuáticas tiene una posibilidades adicional porque las células u hojas en el agua están frecuentemente expuestas a HCO_3^- . La toma activa de HCO_3^- a nivel de membrana plasmática o cloroplástica puede ser una forma efectiva para concentrar el CO_2 . Estos sistemas ocurren en cianobacteria y algas, y probablemente en las angiospermas acuáticas, siendo menos caracterizados en estas últimas. En el caso de angiospermas, si bien el HCO_3^- es utilizado no es un verdadero mecanismo de “up-take” de HCO_3^- o CCM porque el CO_2 difunde pasivamente hacia la hoja a través de un gradiente de concentración (Bowes et al., 2002).

³Los valores de fotosíntesis neta de plantas acuáticas sumergidas son menores que aquellos de plantas terrestres. A los niveles de CO_2 y O_2 en el ambiente (de 0,035 y 21% en la fase gaseosa y de 10 y 240 μM en la fase acuosa, respectivamente), la velocidad de fotosíntesis en condiciones de luz saturante es frecuentemente 1-20 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ clorofila h}^{-1}$. Bajo condiciones saturantes de concentraciones de especies disueltas de carbono inorgánico la fotosíntesis neta es de 50-150 $\text{mmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ clorofila h}^{-1}$, pero estas velocidades están aún muy por debajo de los valores de plantas terrestres en condiciones ambientales de CO_2 . La concentración de CO_2 libre para saturar la fotosíntesis en especies acuáticas es de aproximadamente 350-600 mM, y de aproximadamente 10-30 veces mayor que lo requerido para plantas C_3 terrestres. En conjunto con estos altos requerimientos de saturación, estas especies exhiben alta K_m (CO_2) fotosintética aparente (40-700 mM); en contraste con las plantas terrestres en donde estos valores son de aproximadamente 10 mM (Bowes y Salvucci, 1989).

terística más interesante es la plasticidad que estas plantas acuáticas muestran en relación a su bioquímica, fisiología y algunas veces su anatomía, en relación a la fotosíntesis (Bowes y Salvucci, 1989). Cuando algunas macrófitas acuáticas sumergidas con metabolismo C_3 son crecidas bajo condiciones de estrés causadas por bajas concentraciones de CO_2 , altas temperaturas y fotoperíodos prolongados, presentan bajos puntos de compensación de CO_2 , lo cual es característico de plantas C_4 (Salvucci y Bowes, 1981, 1983; Holaday et al., 1983; Bowes y Salvucci, 1989; Reinskind et al., 1997). Existen evidencias que al menos tres miembros de la familia Hydrocharitaceae – *Egeria densa*, *Hydrilla verticillata* y *Elodea canadensis* – muestran un metabolismo fotosintético tipo C_4 sin la característica anatomía Kranz, pero con la típica incorporación de carbono marcado radioactivamente en malato y aspartato (Brown et al., 1974; De Groot y Kennedy, 1977; Browse et al., 1980; Salvucci y Bowes, 1983). Así, en *E. densa* e *H. verticillata*, bajos niveles de CO_2 producen un cambio en los productos primarios de la fijación del CO_2 formados, con niveles aumentados de malato a expensas de los intermediarios del ciclo de Calvin (Browse et al., 1977; Holaday y Bowes, 1980). De esta manera, se logra un aumento de la concentración del CO_2 en el sitio de carboxilación de la RuBisCO, con la concomitante disminución de la fotorrespiración y de los efectos inhibitorios del O_2 en la fotosíntesis (Badger y Price, 1992). De esta manera, además de la utilización de HCO_3^- , la fijación de CO_2 en ácidos C_4 podría ser parte de un mecanismo concentrador del carbono para mejorar la fotosíntesis bajo condiciones limitantes del mismo.

ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN DE METABOLISMO C_3 A TIPO C_4 EN *EGERIA DENSA*

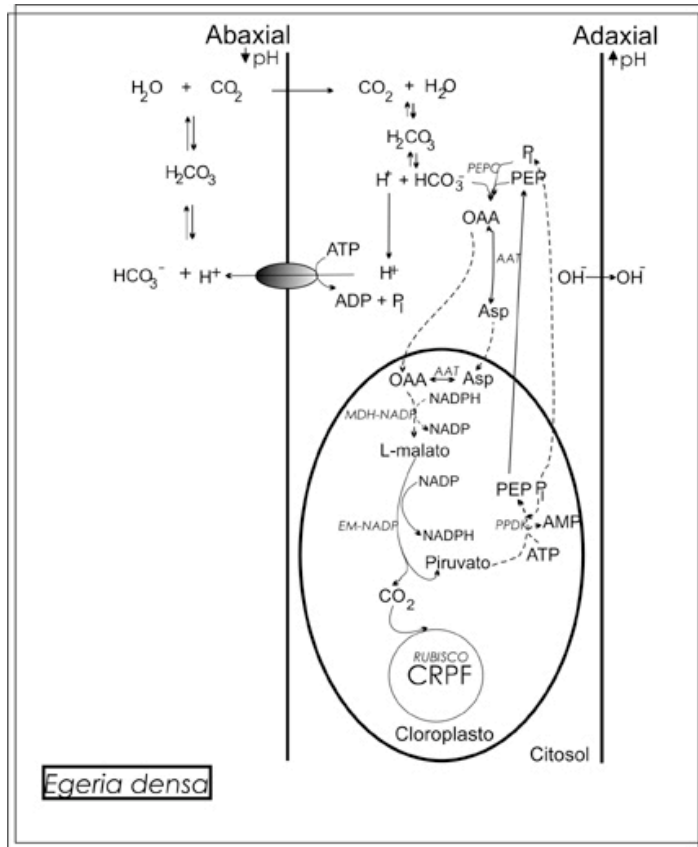
Egeria densa como especie modelo

Dentro de las especies acuáticas superiores *E. densa* ha sido un material de elección para un gran número de estudios de fisiología vegetal. Una de las razones principales se debe a que sus hojas contienen una vaina simple longitudinal y que consiste en sólo dos capas celulares, lo que permite realizar estudios a nivel de sistema completo sin daño dentro, de un ambiente natural. De esta manera, en esta planta la heterogeneidad es reducida al mínimo, todas las células de la hoja están en contacto con el medio externo y en el mismo estado de desarrollo, y así en condiciones fisiológicas similares. Estas propiedades junto con la polaridad de la hoja de *E. densa*, representan una gran ventaja para diferentes estudios, y hacen de esta especie un modelo para la experimentación, dentro del reino vegetal, como por ejemplo la electrofisiología (Lara et al. 2002).

De esta manera, se ha estudiado la transición de metabolismo C_3 a C_4 en la especie *E. densa*, principalmente a través de la caracterización de la enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzimas claves en la fotosíntesis C_4 . Este sistema es interesante para el estudio de la inducción de la fotosíntesis C_4 debido a que posee una anatomía más simple que la presente en plantas terrestres C_4 . Además, permite avanzar en el estudio de la transición de metabolismo C_3 a C_4 , tal como ha ocurrido durante la evolución de los organismos fotosintéticos.

Fijación fotosintética del carbono

La Figura 1 muestra el modelo simplificado para el mecanismo concentrador del CO_2 propuesto para *E. densa* bajo condiciones



In: Prado, CHBA; Casali, CA. Fisiología Vegetal: prácticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri, editora Manole, 2006. ISBN: 85.204.1553-9. www.manole.com.br/ fisiologiavegetal

Figura 1 Modelo simplificado del mecanismo concentrador de CO₂ propuesto en hojas de *E. densa* bajo condiciones de alta temperatura y luz (ATL). La fijación de CO₂ en ácidos orgánicos, como el uso de HCO₃⁻, podrían ser parte de un mecanismo para mejorar la fotosíntesis bajo condiciones de carbono limitante. Este mecanismo tendría lugar en una sola célula fotosintética. CRPF = Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato. MDH-NADP = malato deshidrogenasa dependiente de NADP. PDK = piruvato ortofosfato diquinasa. AAT = aspartato aminotransferasa. PEPC = fosfoenolpiruvato carboxilasa. EM-NADP = enzima málica dependiente de NADP.

Tabla I. Adaptaciones de las plantas acuáticas sumergidas para vivir en el agua. Se mencionan las diferencias más significativas (Sculthorpe, 1967).

<p>Presencia mínima o ausencia de tejido de sostén en los tallos y en los pecíolos de las hojas debido a que normalmente el agua que las rodea se comporta como sostén.</p>
<p>Carencia de tejido externo de protección requerido por las plantas terrestres para limitar la pérdida de agua. La pared externa de la epidermis muestra muy poca o escasa formación de capa cuticular. Toda la superficie es capaz de absorber agua, nutrientes y gases disueltos a partir del agua que rodea la planta. La pared celulósica es delgada y permite una real absorción del agua. Además, las hojas de plantas sumergidas no poseen estomas, en el caso de plantas flotantes se encuentran en la cara superior. Los minerales son absorbidos a través de ciertas áreas de la epidermis, los hidropoten que son estructuras permeables como grupo de células, pelos mucilaginosos o glándulas complejas.</p>
<p>En general el xilema, que normalmente transporta agua desde las raíces a toda la planta, está pobremente desarrollado o ausente. En algunas especies el floema se encuentra más desarrollado que el xilema.</p>
<p>Las raíces se encuentran reducidas y su función principal es la de anclaje y no de absorción de nutrientes y agua. Los pelos de las raíces están ausentes.</p>
<p>Muchas especies poseen hojas con formas muy especializadas, en general divididas o aserradas, generando una gran superficie para la absorción y para la fotosíntesis. Además, se minimiza la resistencia al agua y el posible daño a las hojas. La heterofilia, fenómeno que representa la formación de diferentes tipos de hojas dependiendo del medio en que se encuentra la planta, es frecuentemente encontrada entre diferentes especies vegetales acuáticas.</p>
<p>La presencia de cámaras aéreas con diafragma que se extienden dentro de las hojas y tallos, es característica de plantas acuáticas sumergidas.</p>

In: Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Barueri, editora Manole, 2006. ISBN: 85.204.1553-9. www.manole.com.br/fisiologiavegetal

de limitada disponibilidad de CO_2 . Además, se indica en forma combinada la existencia de una fotosíntesis del tipo C_4 y de un mecanismo de polaridad de la hoja que es sugerido para el uso de HCO_3^- .

Caracterización electrofisiológica

Estudios electrofisiológicos de toma controlada o cambios de pH combinados con curvas de fotosíntesis, indican la habilidad de *E. densa* para utilizar HCO_3^- como fuente de carbono inorgánico y muestran que esta especie exhibe incrementados valores de fotosíntesis máxima y de tasas de respiración cuando la disponibilidad de HCO_3^- es mayor (Kahara y Vermaat, 2003).

En condiciones de alta intensidad lumínica y baja cantidad de CO_2 disuelto, *E. densa* desarrolla regiones de bajo pH en la cara abaxial de la hoja, que permiten el ingreso de CO_2 por difusión pasiva, cuando el HCO_3^- es combinado con los H^+ excretados del interior celular a través de una H^+ -ATPasa localizada en la membrana plasmática (Staal et al., 1989; Miedma y Prins, 1991; Miedma et al., 1996). De esta manera, se produce una hiperpolarización de la membrana plasmática y acidificación del medio que circunda la cara inferior de la hoja, proporcionando la fuerza conductora para el transporte eléctricamente acoplado a este gradiente de H^+ (Buschman et al. 1996). Un eflujo de OH^- de la cara superior de la hoja, junto con un flujo de K^+ de la cara abaxial a la solución tiene lugar para balancear la pérdida de H^+ del citosol. De este modo, la reducción fotosintética del HCO_3^- llevada a cabo por estas plantas apolares produce un OH^- por cada CO_2 asimilado. La acidificación en la cara inferior de la hoja resulta en un cambio en el equilibrio de HCO_3^- a CO_2 con el CO_2 entrando a la célula por la cara abaxial a través de difusión pasiva.

Caracterización bioquímica

En hojas de *E. densa* crecidas a bajos niveles de CO₂, la concentración de malato aumenta a expensas de intermediarios del ciclo de Calvin (Browse et al., 1977; Holaday y Bowes, 1980); y el punto de compensación de CO₂ disminuye en esta condición (recordar que las especies C₄ poseen puntos de compensación menores a los de las plantas C₃), junto con la inhibición de la fotosíntesis por O₂. Además, estos cambios se acompañan con un incremento de las actividades de algunas enzimas del ciclo C₄ como aspartato y alanina aminotransferasas (Salvucci y Bowes, 1981).

En particular se estudiaron dos enzimas involucradas en el metabolismo C₄, la PEPC y la EM-NADP, en hojas de *E. densa* en condiciones de baja temperatura y luz (BTL, 30 μmol m⁻² s⁻¹ y 12°C) en donde la disponibilidad de CO₂ es suficiente y en condiciones de alta temperatura (ATL, 300 μmol m⁻² s⁻¹ y 30°C) donde el CO₂ es limitante. En estas condiciones, las plantas presentan alto (43 mL CO₂ L⁻¹) y bajo punto de compensación de CO₂ (17 mL CO₂ L⁻¹), respectivamente (Salvucci y Bowes, 1981). Así, durante un período de transferencia de condiciones de BTL a un estado de ATL de 23 d'as, las actividades de ambas enzimas se incrementan. La PEPC presenta el mayor y más pronunciado aumento de la actividad (3,7 veces en relación a los valores determinados en plantas a BTL). La EM-NADP, presenta un incremento de 3 veces en la actividad, el cual se produce lentamente a través del período de inducción. Estudios de Western blot⁴ realizados indican que el aumento en la

⁴Western blot: Técnica para detectar determinadas proteínas de una mezcla, separadas previamente por electroforesis y luego enfrentadas a un anticuerpo específico. En este caso en particular se utilizaron anticuerpos contra la EM-NADP de 62 kDa de hojas de *Zea mays* o anticuerpos obtenidos contra la PEPC de hojas de *Amaranthus viridis*.

Tabla II. Comparación de las propiedades de la EM-NADP de *E. densa* con isoformas de otras fuentes. [&]Los valores de K_m y $S_{0,5}$ fueron estimados al pH óptimo de cada enzima. [#] $S_{0,5}$; *Isoforma fotosintética. N. D., no determinada. Referencias: ^aDrincovich et al., 1991; ^bMaurino et al., 1996; ^cMaurino et al., 2001; ^dCasati et al., 1997; ^eCasati et al., 1999; ^fCasati et al., 2000.

EM-NADP					
	<i>Z. mays</i> ^{*a}	<i>Z. mays</i> ^{b, c}	<i>T.aestivum</i> ^d	<i>F. floridana</i> ^e	<i>E. densa</i> ^f
Tipo de especie	C ₄	C ₄	C ₃	Intermediaria C ₃ -C ₄	C ₃ a tipo C ₄
pH óptimo	8,0	7,5	7,2	7,5	7,3
Actividad específica (U/mg)	30,9	1,4	0,98	15	1,16
K_m (L-malato) (mM) ^{&}	0,19	0,20	0,96	0,46	4,1 [#]
Inhibición por L-malato (pH 7,0)	Si	No	No	No	No
K_m (NADP) (μ M) ^{&}	8,6	6,5	37	12	50,1
K_m (Mg ²⁺) (mM) ^{&}	0,23-0,05	0,22-0,099	0,20-0,006	0,16-0,005	1,41

actividad se correlaciona con ascensos en los niveles de proteínas (Casati et al. 2000). En consecuencia, la disminución del punto de compensación de CO₂ que se produce cuando esta especie es transferida de condiciones de BTL a ATL, puede relacionarse con la inducción de estas enzimas. Además, se ha visto que no existe variación importante en la actividad de la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) en ambas condiciones, siendo de

76,0 y 70,6 mmol mg⁻¹ clorofila h⁻¹, respectivamente (Salvucci y Bowes, 1981); ni en los niveles de la subunidad mayor de la RuBisCO determinados por estudios de Western blot (Casati et al. 2000). De esta manera, el rol regulatorio de la RuBisCO en la fotosíntesis sería menor que en plantas terrestres C₃.

El análisis de las propiedades cinéticas de la EM-NADP purificada de hojas mantenidas durante 23 días bajo condiciones de ATL, indica que es similar a la isoforma de especies terrestres C₃ (Tabla II). A diferencia de las EM-NADP del tipo C₄, dicha isoforma posee un pH óptimo más ácido y no es inhibida por L-malato (Drincovich et al., 2001). La enzima presenta baja afinidad por sus sustratos L-malato y NADP, y exhibe una actividad específica comparable a la de la enzima presente en plantas C₃, como trigo y a la isoforma no fotosintética presente en maíz. De esta manera, *E. densa* respondería a la disminución en la concentración del CO₂ del medio a través de la inducción de una isoforma del tipo ancestral de la EM-NADP, con propiedades físicas y cinéticas similares a las de plantas C₃. El incremento en la cantidad de esta enzima, luego de la exposición a condiciones de ATL, podría facilitar el mantenimiento de altas tasas de decarboxilación del malato y el envío de CO₂ a la RuBisCO.

Dos isoformas diferentes de la PEPC están presentes en hojas de *E. densa* mantenidas bajo condiciones de ATL y BTL. La isoforma de menor masa molecular (108 kDa) es claramente inducida luego de 23 días bajo condiciones de ATL mientras que la isoforma de 115 kDa no es modificada luego de este tratamiento. La isoforma de 108 kDa purificada de plantas de *Egeria densa* mantenidas a ATL presenta un valor bajo de K_m(PEP) y un valor muy bajo de K_m(HCO₃⁻) de 7,7 μM (Casati et al., 2000). Todos los valores de K_m(HCO₃⁻) descriptos para PEPC de diferentes fuentes C₄ (Bauwe 1986) son mayores que el valor obtenido para la isoforma

Tabla III. Grado de fosforilación y parámetros cinéticos y regulatorios de la PEPC de extractos crudos de plantas de *E. densa*. Se presentan los resultados obtenidos del análisis de plantas mantenidas en condiciones de baja temperatura y luz (BTL, fotosíntesis C₃) y de alta luz y temperatura (ATL, fotosíntesis del tipo-C₄). Las muestras fueron recolectadas luego de 5 horas de un período de oscuridad y luego de un período de 1 h 30 min de iluminación, con excepción de las plantas que fueron sometidas a estudios de fosforilación *in vivo* las cuales fueron recolectadas a las 5 horas de iluminación. El grado de fosforilación se expresa en relación a los niveles de muestras mantenidas en condiciones de BTL y recolectadas en la oscuridad. N.D.: no determinado. Tabla modificada de Lara et al., 2002.

Condicion	Período	Fosforilacion relativa	I ₅₀ (L-malato) (mM)	K _m (PEP) (mM)	V _{max} (U mg ⁻¹)
BTL	Oscuridad	1	N.D.	N.D.	N.D.
	Luz	1,18 ± 0,09	N.D.	N.D.	N.D.
ATL	Oscuridad	1,08 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	Luz	1,84 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01

de PEPC 108 kDa de *E. densa* purificada. Así, esta isoforma poseería una alta afinidad por sus sustratos y sería inducida por condiciones de baja disponibilidad de CO₂. El análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de la PEPC en hojas de *E. densa* en condiciones de luz y de oscuridad indica que en plantas mantenidas durante 23 días bajo condiciones de ATL, los parámetros cinéticos V_{máx}, K_m(PEP) e I₅₀(L-malato) se modifican en muestras tomadas en la oscuridad en comparación con aquellos de muestras recolectadas en la luz (Lara et al., 2001). Así, la afinidad

de la enzima por el PEP parecería ser mayor para la forma de la enzima obtenida en la luz. Además, la isoforma de menor masa molecular presente en las hojas de *E. densa*, que es la forma que es inducida por condiciones de ATL, es modificada por fosforilación en forma dependiente de la luz (Tabla III). Así, este cambio en el estado de fosforilación parecería ser responsable de la modificación de los parámetros cinéticos y regulatorios de la PEPC, incrementando la eficiencia de esta enzima durante el día, cuando tiene lugar la fotosíntesis. En consecuencia, los estudios realizados indicarían el primer sistema de fosforilación de la PEPC de una planta acuática y que la regulación de la isoforma de 108 kDa de PEPC es similar a aquella de la enzima proveniente de plantas terrestres C_4 , avalando la idea que la isoforma de menor masa molecular participaría en un mecanismo del tipo C_4 en esta especie acuática sumergida. En contraste, la isoforma de mayor masa molecular no muestra fosforilación bajo las condiciones estudiadas. Es más, esta isoforma no es inducida por condiciones de ATL; y, probablemente no estaría involucrada en el proceso fotosintético de fijación del carbono en esta especie, teniendo posiblemente una función anaplerótica.³ No obstante, no puede descartarse que esta isoforma pueda regularse por fosforilación bajo otras condiciones, como por ejemplo, deficiencia de N_2 , y como ha sido descrito para la PEPC de nódulos de raíces de soja y de hojas maduras de maíz (Ueno et al., 2000). Si ambas isoformas de la PEPC están presentes en la misma célula de *E. densa*, es interesante el hecho de que la PEPC kinasa (PEPC-K) pueda discriminar entre ambas isoformas y realizar una fosforilación diferencial.

³Reacción anaplerótica: se refiere a la PEPC actuando como reacción de relleno que proporciona al ciclo de Krebs los intermediarios que son consumidos por otras reacciones.

Estudios de fraccionamiento celular seguido de análisis de Western blot indican que la PEPC, como en plantas C_4 , está localizada en el citosol de las células de *E. densa*, mientras que la EM-NADP y la RuBisCO están localizadas en los cloroplastos. La localización específica de estas enzimas sería muy importante para el envío del carbono inorgánico desde el citosol hacia el cloroplasto, a través de ácidos C_4 . Así, el cloroplasto sería el sitio de generación del CO_2 , y consecuentemente el del mecanismo concentrador de CO_2 (Casati et al., 2000).

CONTEXTO EVOLUTIVO

Dentro de los organismos acuáticos, varios casos de mecanismos concentradores de CO_2 han sido descritos. Por ejemplo, en el alga macroscópica *Udotea flabellum* se ha demostrado una forma de fotosíntesis del tipo C_4 (Reinskind y Bowes, 1991). Más recientemente, se ha sugerido que en una diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* una forma de fotosíntesis del tipo C_4 sustenta la asimilación de carbono (Reinfelder et al., 2000). La mayor diversificación de las diatomeas ocurrió durante el período mesozoico en el cual la concentración de CO_2 era menor en las primeras eras (Precámbrico y Paleozoico) en las cuales evolucionaron la mayoría de los microorganismos fotosintéticos. De esta manera, la asimilación del carbono del tipo C_4 en organismos unicelulares puede haber precedido a la aparición de plantas multicelulares. Más aún, se ha sugerido que la anatomía C_4 no sería esencial para la fotosíntesis C_4 en plantas terrestres. Se ha proporcionado evidencia de que este tipo de fotosíntesis podría operar dentro de una sola célula fotosintética en la especie terrestre *Borszczowia aralocaspica* (Voznesenskaya et al., 2001). Dentro de las angiospermas, al menos tres miembros de la familia

Hydrocharitaceae poseen un mecanismo concentrador del CO_2 bajo ciertas condiciones ambientales (Salvucci y Bowes, 1981; Maging et al., 1997). De esta manera, tanto el uso de HCO_3^- como la concentración del CO_2 del tipo C_4 , podrían ser mecanismos muy antiguos, especialmente considerando que la familia de monocotiledóneas Hydrocharitaceae, a la cual pertenece *E. densa*, se originó 100 millones de años atrás en el período cretáceo y que podría ser más antigua que las monocotiledóneas C_4 terrestres, las cuales se volvieron más abundantes en el Mioceno. Así, el mecanismo del tipo C_4 que en *E. densa* tendría lugar en una sola célula, podría representar una forma ancestral de la fotosíntesis C_4 con respecto a la que ocurre en plantas terrestres.

REFERENCIAS

- BAUWE, H. (1986) An efficient method for the determination of K_m values for HCO_3^- of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* 169, 356-360.
- BADGER, M.R. y PRICE, G.D. (1992) The CO_2 concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol. Plant.* 84,606-615.
- BOWES, G. y SALVUCCI, M.E. (1989) Plasticity in the photosynthetic carbon metabolism of submersed aquatic macrophytes. *Aquat. Bot.* 34, 233-266.
- BROWN, J.M.A.; DROMGOOLE, F.I.; TOWSEY, M.W. y BROWSE, J. (1974) Photosynthesis and photorespiration in aquatic macrophytes. En: Mechanism of regulation of Plant growth. BIELESKI, R.L.; FERGUSON, A.R.; CRESSWELL, M.M.(eds). The Royal Society of New Zealand, Wellington, pp 243-249.
- BROWSE, J.A.; BROWN, J.M.A. y DROMGOOLE, F.I. (1980) Malate synthesis and metabolism during photosynthesis in *Egeria densa* Planch. *Aquat. Bot.* 8, 295-305.

- BROWSE, J.A.; DROMGOOLE, F.I. y BROWN, J.M.A. (1977). Photosynthesis in the aquatic macrophyte *Egeria densa*. I. $^{14}\text{CO}_2$ fixation at natural CO_2 concentrations. Aust. J. Plant Physiol. 4, 169-176.
- BUSCHMANN, P.; SACK, H.; KÖHLER, A.E. y DAHSE, I. (1996) Modeling plasmalemma ion transport of the aquatic plant *Egeria densa*. J. Membrane Biol. 154, 109-118.
- CASATI, P.; FRESCO A.G.; ANDREO C.S.; DRINCOVICH M.F. (1999) An intermediate form of NADP-malic enzyme from the C_3C_4 intermediate species *Flaveria floridana*. Plant Science 147, 101-109.
- CASATI, P.; LARA, M.V. y ANDREO C.S. (2000) Induction of a C_4 -like mechanism of CO_2 fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. Plant Physiol. 123:1611-1623.
- CASATI, P.; LARA, M.V. y ANDREO C.S. (2002) Regulation of enzymes involved in C_4 photosynthesis and the antioxidant metabolism by UV-B radiation in *Egeria densa*, a Submersed Aquatic Species. Photos. Res. 71:251-264.
- CASATI, P.; SPAMPINATO, C.P. y ANDREO, C.S. (1997) Characteristics and physiological function of NADP-Malic enzyme from wheat. Plant Cell Physiol. 38, 928-934.
- DE GROOTE, D. y KENNEDY, R.A. (1977) Photosynthesis in *Elodea canadensis* Michx. Four carbon acid synthesis. Plant Physiol. 59, 1133-1135.
- DRINCOVICH, M.F.; IGLESIAS, A.A. y ANDREO, C.S. (1991) Interaction of divalent metal ions with NADP-malic enzyme from maize leaves. Physiol. Plant. 81, 462-466.
- DRINCOVICH, M.F.; CASATI, P. y ANDREO, C.S. (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. FEBS Lett. 290, 1-6.
- HOLADAY, A.S. y BOWES, G. (1980) C_4 metabolism and dark CO_2 fixation in a submersed aquatic macrophyte (*Hydrilla verticillata*). Plant Physiol. 89, 1231-1237.
- HOLADAY, A.S.; SALVUCCI, M.E. y BOWES, G (1983) Variable photosynthesis/photorespiration ratios in *Hydrilla* and other submersed aquatic macrophyte species. Can. J. Bot. 61, 229-236.

- KAHARA, S.N. y VERMAAT, J.E. (2003) The effect of alkalinity on photosynthesis-light curves and inorganic carbon extraction capacity of freshwater macrophytes. *Aquat. Bot.* 75, 217-227.
- LARA, M.V.; CASATI, P.; y ANDREO C.S. (2001) *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Egeria densa*, a submersed aquatic species *Plant Cell Physiol.* 42, 441-445.
- LARA, M.V.; CASATI, P.; y ANDREO C.S. (2002) CO₂ concentration mechanisms in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. *Physiol. Plantarum* 115, 487-495.
- MADSEN T.V.; MABERLY, S.C. y BOWES, G. (1996) Photosynthetic acclimation of submersed angiosperms to CO₂ and HCO₃⁻. *Aquatic Bot.* 53, 15-30.
- MADSEN, J.S. y SAND-JENSEN, K. (1991) Photosynthetic carbon assimilation in aquatic macrophytes. *Aquat. Bot.* 41, 5-40.
- MAGNIN, N.C.; COOLEY, B.A.; REISKIND, J.B. y BOWES, G. (1997) Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C₄ type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol* 115, 1681-1689.
- MARBELY, S.C. (1985) Photosynthesis by *Fontinalis antipyretica* II. Assessment of environmental factors limiting photosynthesis and production. *New. Phytol.* 100, 141-155.
- MAURINO, V.G.; DRINCOVICH, M.F. y ANDREO, C.S. (1996) NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, 239-250.
- MAURINO, V.G.; SAIGO, M.; ANDREO, C.S. y DRINCOVICH, M.F. (2001) Non-photosynthetic "malic enzyme" from maize. A constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol. Biol.* 45, 409-420.
- MIEDEMA, H. y PRINS, H.B.A. (1991) pH-dependent proton permeability of the plasma membrane is a regulating mechanism of polar transport through the submerged leaves of *Potamogeton lucens*. *Can. J. Bot.* 69, 1116-1122.
- MIEDEMA, H.; STAAL, M. y PRINS, H.B.A. (1996) pH-induced proton permeability changes of plasma vesicles. *J. Membr. Biol.* 152, 159-167.

- RAVEN, J.A. (1970) Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biol. Rev.* 45, 167-221.
- REINFELDER, J.R.; KRAEPIEL, A.M. y MOREL, F.M.M. (2000) Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature* 407, 996-999.
- REISKIND, J.B. y BOWES, G. (1991) The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C₄-like photosynthetic characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8, 2882-2887.
- REISKIND, J.B.; MADSEN, T.V.; VAN GINKEL, L.C. y 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.
- SALVUCCI, M.E. y BOWES, G. (1981) Induction of reduced photorespiratory activity in submersed and amphibious aquatic macrophytes. *Plant Physiol.* 67, 335-340.
- SALVUCCI, M.E. y BOWES, G. (1983) Two photosynthetic mechanisms mediating the low photorespiratory state in submersed aquatic angiosperms. *Plant Physiol.* 73, 488-496.
- SCULTHORPE, C.D. (1967) The biology of aquatic vascular Plants. E Arnold (Publishers) Ltd. Pp 93-150.
- STAAL, M.; ELZENGA, J.T.M. y PRINS, H.B.A. (1989) ¹⁴C fixation by leaves and leaf cell protoplasts of the submerged aquatic angiosperm *Potamogeton lucens* L.: carbon dioxide or bicarbonate? *Plant Physiol.* 90, 1035-1040.
- UENO, Y.; IMANARI, I.; EMURA, j.; YOSHIKAWA-KUMAGAYE, K.; NAKAJIMA, K.; INAMI, K.; SHIBA, T.; SAKAKIBARA, H.; SUGIYAMA, T. y IZUI, K. (2000) Immunological analysis of the phosphorylation state of maize C₄-form phosphoenolpyruvate carboxylase with specific antibodies raised against a synthetic phosphorylated peptide. *Plant J.* 21, 17-26.
- VAN, T.K. y HALLER, W.T. (1976) Comparison of the photosynthetic characteristics of three submersed aquatic plant. *Plant Physiol.* 58, 761-768.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; FREOTAG, H. y EDWARDS, G.E. (2001) Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature* 414, 543-546.