

## LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y CON EL ESTRÉS HÍDRICO

Rosario Álvarez, Arancha León y Cristina Echevarría

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla, Avenida de la Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

### INTRODUCCIÓN

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) es un enzima citosólico ampliamente distribuido en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet et al., 1996). Cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y de un catión divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir oxalacetato (OAA) y Pi (Chollet et al., 1996). El OAA producido es rápidamente transformado a malato por la malato deshidrogenasa (MDH), siendo éste el primer producto estable de la reacción. El malato producido puede ser utilizado como fuente de carbono y poder reductor en múltiples contextos fisiológicos de la planta.

La PEPC ha sido muy estudiada en plantas  $\text{C}_4$  y CAM en las que juega un papel esencial en el metabolismo fotosintético del carbono. En órganos no fotosintéticos, como la raíz, la PEPC tiene una función anaplerótica mediante la que repone oxaloacetato (OAA) para el ciclo de Krebs en condiciones en que la demanda de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos es alta (Huppe y Turpin, 1994). Estos aminoácidos estarían destinados a la síntesis proteica, o a su utilización como osmolitos (prolina, glicina-betaína) en respuesta a situaciones de estrés.

La PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible, tanto en plantas  $\text{C}_3$  como  $\text{C}_4$  y CAM (Echevarría y Vidal, 2003). Cuando la PEPC está fosforilada es menos sensible al L-malato (su efector negativo), responde mejor a glucosa 6-P, y es más eficaz a pH subóptimo pero fisiológico de 7,1 y 7,3 (Echevarría et al., 1994, Echevarría y Vidal, 2003). *In vitro*, las diferencias entre una PEPC fosforilada y una PEPC defosforilada sólo se detectan a pH subóptimo de 7,3. Si se determina la actividad *in vitro* del enzima a pH 8 (pH óptimo) las diferencias del estado de fosforilación de la PEPC no se detectan.

Para determinar el grado de fosforilación *in vivo* de la PEPC se utiliza el test del malato, que mide la sensibilidad del enzima al L-malato ( $\text{IC}_{50}$ ) en condiciones subóptimas de pH 7,3 y PEP 2,5 mM. En estas condiciones de ensayo, el enzima fosforilado presenta una  $\text{IC}_{50}$  para el L-malato de 2 a 3 veces mayor que el enzima defosforilado (Jiao y Chollet, 1991). La PEPC puede, por tanto, aumentar su actividad por dos mecanismos:

## **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

1) aumentando la cantidad de enzima, que se evalúa a pH óptimo de 8, y/o 2) aumentando el estado de fosforilación del enzima, que se evalúa determinando la sensibilidad del enzima al L-malato ( $IC_{50}$ ). Una  $IC_{50}$  alta representa un enzima fosforilado y más activo en presencia de su efector negativo el L-malato.

Existen datos experimentales que muestran que la presencia de una alta concentración de nitrato aumenta el flujo de carbono hacia la PEPC para suministrar esqueletos carbonados al ciclo de Krebs (Vidal et al., 2002). En general, la actividad de la PEPC repercute en el balance C/N de la planta. Cuando la síntesis de aminoácidos y proteínas es intensa, en periodos de desarrollo de la planta muy activos, la PEPC suministra esqueletos carbonados extras, es decir que no provienen de la fotosíntesis, recapturando el  $CO_2$  respirado. Estos esqueletos de carbono son utilizados tanto en la respiración como en la síntesis de proteínas. Esta es la llamada función anaplerótica de la PEPC que juega un papel importante tanto en hojas como en órganos sumergidos como las raíces.

La conexión de la PEPC con el metabolismo del nitrógeno ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios. Así, el suministro de nitrato a hojas de trigo iluminadas deficientes en nitrógeno, aumenta significativamente la actividad PEPC-quinasa (enzima responsable de la fosforilación) y el estado de fosforilación de la PEPC, produciendo la activación del enzima y la disminución de la sensibilidad a su efector negativo, el L-malato (Vidal et al., 2002).

En este capítulo se presentan los resultados de los perfiles de actividad PEPC a la largo del cultivo de la remolacha y su grado de fosforilación *in vivo*, en distintos ensayos de campo y laboratorio, con el objeto de establecer cuál es su contribución al desarrollo de la planta, así como, la posible implicación de este enzima en la nutrición nitrogenada y las respuestas a condiciones de estrés hídrico de las raíces de remolacha de siembra otoñal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **· Cultivo de plantas en condiciones controladas de laboratorio**

La germinación de las semillas (variedad Claudia), se llevó a cabo durante dos semanas, a 25°C y en macetas con vermiculita suplementadas con agua. Una vez germinadas, las plantas se traspasaron a cultivos hidropónicos que contenían el medio nutritivo de Hewitt (Hewitt, 1966) suplementado con 1mM (nitrato limitante) o con 15 mM (nitrato a demanda) de  $NO_3Ca$  y se mantuvieron en las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12 h de luz; intensidad luminosa de 350-400  $\mu Em^{-2}s^{-1}$ ; 60-70 % de humedad relativa y una temperatura de 25°C. La solución nutritiva se cambió cada 7 días.

Para las medidas se utilizaron 3 tejidos diferentes: 1) raíces secundarias, 2) 3 cm desde el ápice de la raíz principal, y 3) el resto de la raíz principal.

### • Extracción de la PEPC

Para extraer el enzima, 0,5 g de muestra de raíz se homogeneizaron en un mortero a 4°C con 1 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 20% (v/v), 2-mercaptoetanol 14 mM, PMSF, 1 mM y KF 10 mM. El extracto obtenido se centrifugó a 13.000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad PEPC. La determinación de proteínas solubles en los extractos crudos se realizó según el método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

### • Determinación de la actividad y estado de fosforilación *in vivo* de la PEPC

La determinación de la actividad PEPC en condiciones óptimas se realizó espectrofotométricamente utilizando un ensayo acoplado a la malato deshidrogenasa (MDH) en el que se registra la oxidación del NADH a 340 nm (Echevarría et al., 1994). Una unidad enzimática corresponde a la cantidad de PEPC que cataliza la carboxilación de 1  $\mu$ mol de fosfoenolpiruvato (PEP) por minuto en las condiciones óptimas de ensayo (pH 8).

Para determinar el estado aparente de fosforilación *in vivo* de la PEPC de raíz hemos utilizado el test del malato, basado en el cálculo de la sensibilidad del enzima ( $IC_{50}$ ) a su inhibidor el L-malato. La  $IC_{50}$  se define como la concentración de inhibidor requerida para inhibir al 50% la actividad del enzima. Para ello se determinó la actividad PEPC en condiciones subóptimas de pH (7,3) y en presencia de diferentes concentraciones de L-malato. Unos valores altos de  $IC_{50}$  indican que el enzima se encuentra fosforilado (PEPC más activa) mostrando menos sensibilidad al L-malato. Unos valores bajos de  $IC_{50}$  indican que el enzima se encuentra desfosforilado (PEPC menos activa) y por lo tanto muestra más sensibilidad a su inhibidor (Jiao y Chollet, 1991).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### • Campaña 1999-2000

#### *Ensayos con plantas cultivadas en condiciones controladas de laboratorio*

En la primera campaña (1999/2000), se determinó la actividad PEPC y el grado de fosforilación en tres tejidos diferentes de la raíz de plantas de remolacha. Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas, en cámara de cultivo, y con dos concentraciones de nitrato (NO<sub>3</sub>Ca) en el medio de riego, 1 mM (nitrato limitante) y 15 mM (nitrato a demanda). En la Fig. 1 se muestra el desarrollo de la raíz y de las hojas de plantas de 30 y 75 días de tratamiento. A los 30 días de desarrollo el tratamiento con alto nitrato se manifiesta, fundamentalmente, en un espectacular aumento del porte vegetativo de la planta, mientras que el efecto en la raíz fue menos pronunciado (Fig. 1, 30 días). Sin embargo, a los 75 días de tratamiento, el efecto de alto nitrato se manifiesta claramente en la raíz, produciendo raíces el doble de grandes (Fig. 1, 75 días).

## Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

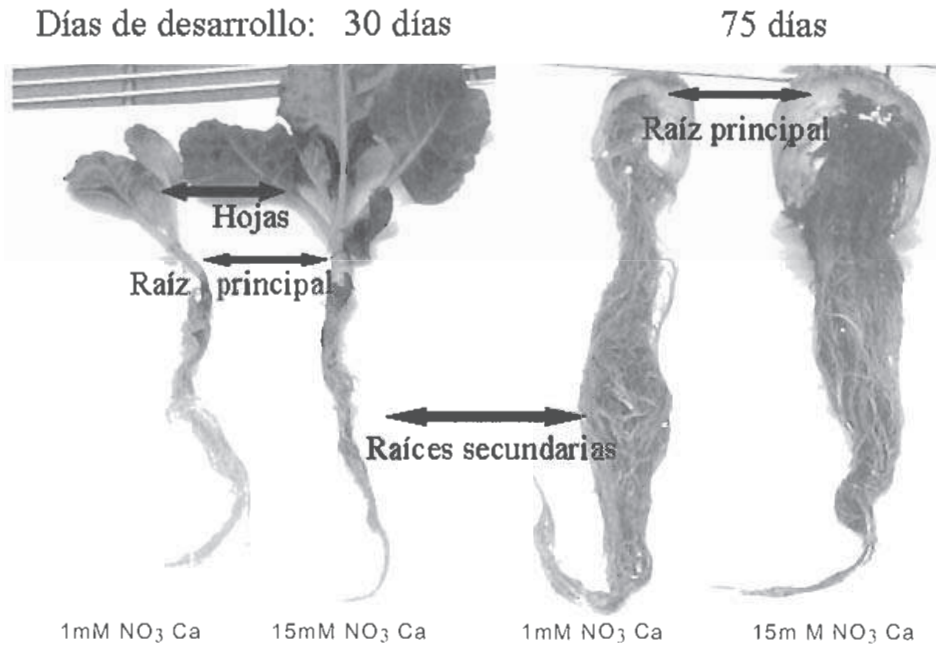


Figura 1. Desarrollo de la raíz y hojas de plantas de remolacha cultivadas en condiciones controladas de laboratorio con distintas concentraciones de nitrato.

En la Fig. 2 se muestra la actividad específica de la PEPC ( $\text{U mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Las determinaciones se hicieron en tres partes diferenciadas de la raíz. En las raíces secundarias, en el ápice de la raíz principal (que llamaremos ápice) y en el resto de la raíz principal (que llamaremos también raíz acumuladora). En raíces secundarias los valores son, en general, más altos ( $0,07$  a  $0,1 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) que en los otros dos tejidos (Fig. 2a), con ligeras variaciones dependiendo del aporte de nitrato, y se mantienen estables durante el desarrollo. En el ápice, la actividad PEPC específica muestra valores de  $0,03$  y  $0,06 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ , manteniéndose también estable con la edad del cultivo (Fig. 2b). En la raíz principal, la actividad aumenta con el desarrollo, alcanzando valores de  $0,09 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ , próximo a los de las raíces secundarias, a los 75 días. En este tejido, a partir de los 45 días, las actividades son entre un 30 y un 50 % más altas en plantas cultivadas con alto nitrato (Fig. 2c).

Para conocer el estado de fosforilación en los diferentes tejidos se determinó la  $\text{IC}_{50}$  para el L-malato (ver materiales y métodos). Los perfiles observados en los diferentes tejidos fueron muy diferentes. En las raíces secundarias, los niveles de fosforilación son bajos y se mantienen bajos durante el desarrollo (Fig. 2d). Estos bajos valores de fosforilación se ven compensados por la abundancia del enzima en este mismo tejido, tal como se muestra en la Fig. 2a. Es decir, menos fosforilado (Fig. 2d), menos activo, pero muy abundante, casi el doble, que en el ápice y en la raíz principal (Fig. 2a, b y c).

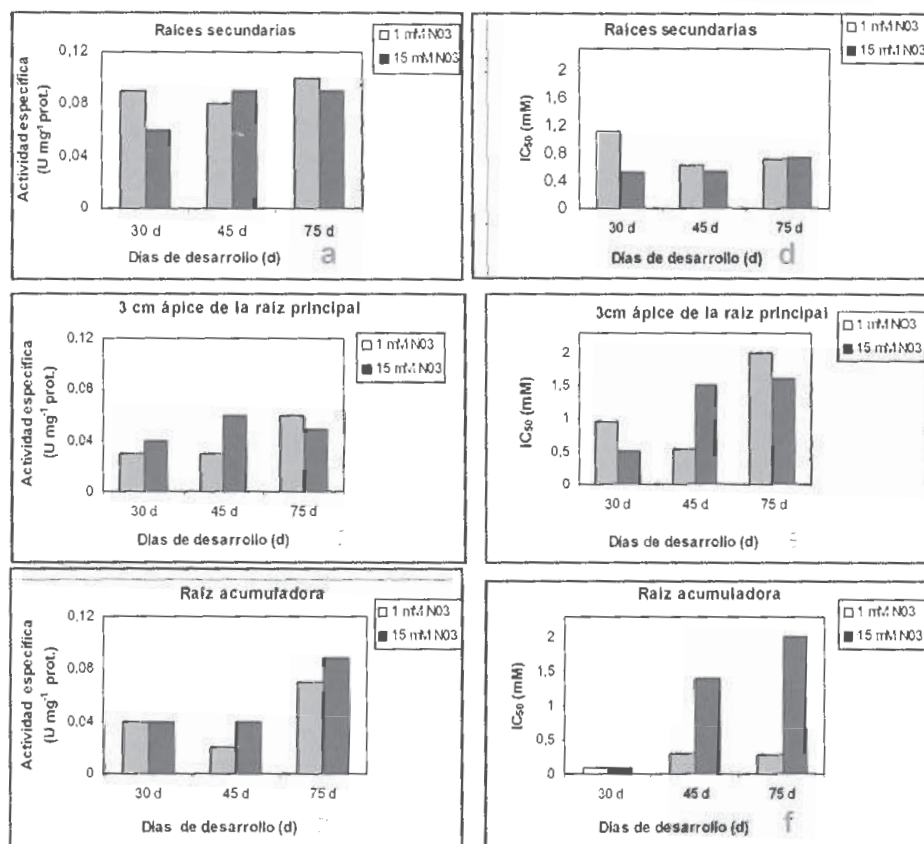


Figura 2. Actividad PEPC específica (U mg<sup>-1</sup> prot.) y sensibilidad al malato (IC<sub>50</sub> (mM)) en relación con el abonado y edad del cultivo en plantas cultivadas en condiciones controladas de laboratorio.

En el ápice, la IC<sub>50</sub> va aumentando con el desarrollo, con altos valores de fosforilación de la PEPC a los 75 días, alcanzándose valores de IC<sub>50</sub> de 1,6 a 2 mM (Fig. 2e). En este tejido el efecto del nitrato no muestra una tendencia clara (Fig. 2e). Por el contrario, en la raíz acumuladora, en plantas cultivadas con nitrato limitante, la PEPC se mantiene desfosforilada en los tres estadios de desarrollo estudiados (Fig. 2f); sin embargo, en plantas cultivadas sin limitación de nitrato se produce un espectacular aumento de la fosforilación de la PEPC a lo largo del desarrollo de la raíz (Fig. 2f). Esta enorme diferencia en el estado de fosforilación de la PEPC de la raíz acumuladora en plantas crecidas en nitrato a demanda, podría, en conjunción con otros factores, estar en la base de las diferencias en el desarrollo de la raíz mostradas en la Fig. 1.

Estos resultados muestran la importancia de la PEPC en las raíces secundarias desde los primeros estadios de desarrollo, donde podría desempeñar un papel fundamental en la absorción de nutrientes (Vidal et al., 2002). En la raíz acumuladora la fosforilación

### Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

de la PEPC es fuertemente inducida por nitrato dando raíces dos veces superiores en tamaño y poniendo de manifiesto el papel relevante de este enzima en la utilización del nitrógeno y en el crecimiento de la raíz.

· Campañas 2000/2001 y 2001/2002

#### Estudio de los ensayos de campo

Evolución de la actividad PEPC de la raíz y estado de fosforilación del enzima en los ensayos de abonado (variedad Claudia).

En la Fig. 3 se representan los valores de actividad específica de la PEPC ( $U\ mg^{-1}\ prot.$ ) para las muestras de campo abonadas con una dosis de nitrógeno recomendada y una dosis de nitrógeno en exceso (recomendada + 300) tanto de la campaña 2000/2001 como de la 2001/2002. En esta última campaña se incluyó, además, un ensayo sin abonado nitrogenado. Estas campañas corresponden a la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> campañas estudiadas. Se observa que los valores de actividad PEPC son muy parecidos en los dos tratamientos de la 2<sup>a</sup> campaña, oscilando entre 0,05 y 0,1  $U\ mg^{-1}\ prot.$  La actividad es muy baja en los meses de invierno. A la salida del invierno la actividad aumenta hasta el mes de Mayo y luego disminuye con la edad del cultivo hasta el mes de Agosto. Los máximos de actividad se registran en los meses de Abril y Mayo, coincidiendo con el periodo de máximo desarrollo vegetativo (Fig. 3, gráfico 1).

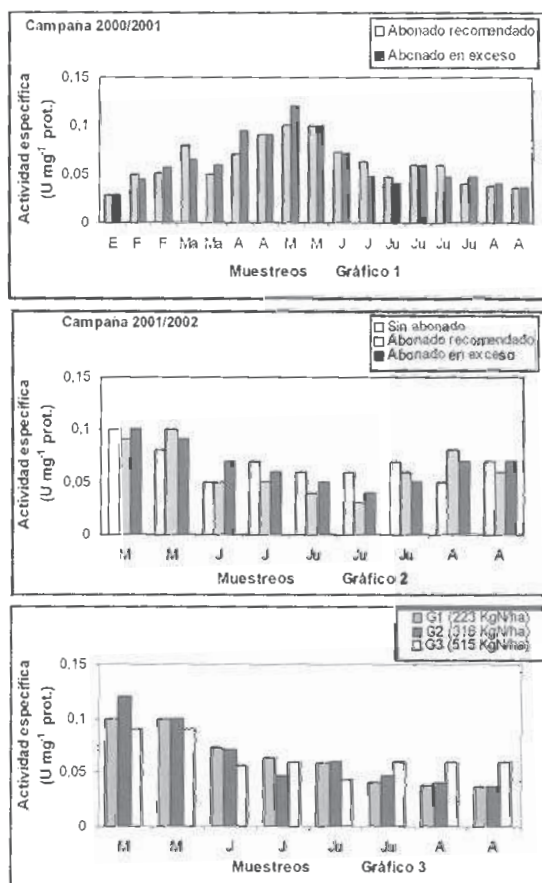


Figura 3. Actividad PEPC específica ( $U\ mg^{-1}\ prot.$ ) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

## Cap VII. La Fosfoenolpiruvato Carboxilasa

En la campaña 2001/2002 las muestras se tomaron a partir de Mayo (Fig. 3, gráfico 2). Se observa que el pico máximo de actividad específica de la PEPC también se produce en Mayo, coincidiendo estos resultados con los de la campaña anterior. La actividad descendió desde valores altos de Mayo ( $0,1 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) hasta los mínimos del 15 de Julio ( $0,03 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). De entre estos datos cabe destacar que a finales de Julio y en el mes de Agosto se produjo un incremento de la actividad PEPC específica manteniéndose los valores de PEPC en torno a  $0,06\text{-}0,07 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$  Al igual que en la campaña anterior no se detectaron diferencias entre los distintos tratamientos con nitrato. En ambas campañas los valores de actividad obtenidos en Abril y Mayo son muy parecidos, indicando que el papel fisiológico del enzima en este período es relativamente independiente de las condiciones ambientales y está más ligado al estadio de desarrollo de la planta. Sin embargo, durante los meses estivales la actividad PEPC fue más alta (un 60% ) en la 3ª campaña (Fig. 3, gráficos 1 y 2).

Según lo referido en este libro (Martínez et al.), existe una discrepancia entre el nitrógeno aportado y el nitrógeno incorporado por la planta. Esto contribuye a que no encontremos diferencias entre los diferentes tratamientos de nitrato (Fig. 3.) Para evitar este problema, se midió la cantidad de nitrato máximo en planta en  $\text{kg N ha}^{-1}$  (medidas realizadas por AIMCRA) en las campañas estudiadas, y se establecieron tres grupos de nitrógeno: **G1**,  $223 \text{ kg ha}^{-1}$ ; **G2**,  $316 \text{ kg ha}^{-1}$ ; **G3**,  $515 \text{ kg ha}^{-1}$  (Tabla 1, Martínez et al., en este libro) que reflejan únicamente la disponibilidad de nitrógeno que tuvo la planta en base a los valores máximos de nitrógeno incorporado de Mayo a Junio. Al agrupar los resultados según este criterio, se observa que los valores más altos de actividad específica de la PEPC se producen en Mayo, coincidiendo con un período de crecimiento activo de la raíz y con la máxima producción foliar (gráfico 5, Martínez et al., en este libro), sin embargo existen muy pocas diferencias entre los diferentes grupos de nitrógeno. Por el contrario, durante el período estival, sí se establecen diferencias entre los diferentes tratamientos con valores de actividad un 50% superior en el G3. (Fig. 3, gráfico 3).

En la Fig. 4, en los gráficos 4 y 5, se representan los valores de  $\text{IC}_{50}$  para el inhibidor L-malato de los distintos ensayos de abonado. En la campaña 2000/2001 (Fig. 4, gráfico 4) se destacan los bajos niveles de fosforilación del enzima durante los meses de invierno. La fosforilación aumenta a la salida del invierno sin que haya una tendencia clara entre los tratamientos, sin embargo en Mayo y Junio la PEPC está más fosforilada en el abonado en exceso (Fig. 4, gráfico 4); posteriormente, los valores fluctúan sin una tendencia clara. En general, aunque los perfiles son muy heterogéneos en las dos campañas, la PEPC de las muestras abonadas con una dosis de nitrógeno en exceso está más fosforilada (valores de  $\text{IC}_{50}$  hasta  $2,5 \text{ mM}$ ), que las muestras abonadas con una dosis recomendada o sin abonado (valores de  $\text{IC}_{50}$  entre  $0,5$  y  $1 \text{ mM}$ ) (Fig.4, gráficos 4 y 5).

Cuando se representan los valores de  $\text{IC}_{50}$  por grupos de nitrógeno se observa que durante los meses de máximo crecimiento de la planta (Mayo y principios de Junio), la PEPC está mucho más fosforilada (valores de  $\text{IC}_{50}$  entre  $1,5$  y  $2 \text{ mM}$ ) en los grupos con más nitrógeno (G2 y G3) (Fig. 4, gráfico 6), mientras que en el G1 los valores son bajos y permanecen bajos con la única excepción de una subida en Agosto.

## Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Durante los meses estivales la  $IC_{50}$  descendió en todos los grupos excepto en el G1 en el mes de Agosto.

Estos resultados indican que el nitrógeno aumenta la actividad de la PEPC aumentando su nivel de fosforilación (tenemos la misma cantidad de enzima pero más activa) durante el período de máximo crecimiento de la raíz (Mayo y Junio). Estos resultados están en consonancia con los descritos en la literatura en donde se muestra que la adición de nitrógeno a plantas de tabaco crecidas en hambre de nitrógeno promueve la activación de la PEPC aumentando el grado de fosforilación del enzima (Vidal et al., 2002). Los resultados mencionados fueron obtenidos en hojas, sin que por el momento se hayan descrito datos respecto a la interacción del nitrógeno y la fosforilación de la PEPC en raíces, excepto los presentados en este trabajo.

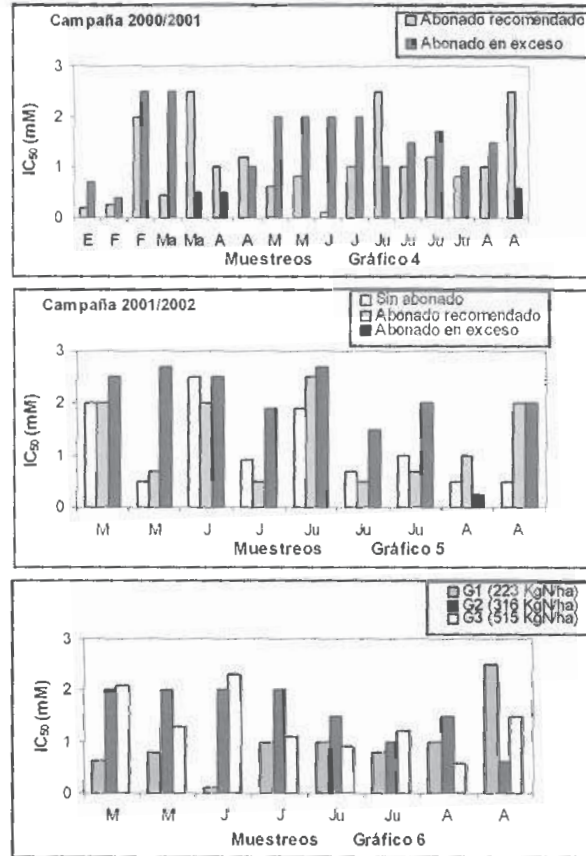


Figura 4. Sensibilidad al málico ( $IC_{50}$  (mM)) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

Finalmente, como la actividad *in vivo* de la PEPC va a depender de la cantidad de enzima (actividad determinada a pH 8) y de su grado de fosforilación ( $IC_{50}$ ) hemos definido un índice que refleje, basado únicamente en la combinación de estos dos parámetros, la eficacia del enzima *in vivo*. Para ello hemos multiplicado los valores de abundancia del enzima (actividad a pH 8), por su grado de fosforilación ( $IC_{50}$ ) y le hemos llamado "Índice de actividad *in vivo*" (IA). Los valores de IA se reflejan en la Fig. 5, y muestran que el índice de actividad es máximo durante los meses de Mayo y Junio coincidiendo con un periodo de máximo desarrollo de la planta. Durante este periodo,



## Cap VII. La Fosfoenolpiruvato Carboxilasa

en los grupos de nitrógeno el óptimo de actividad PEPC se obtiene en el G2 (316 kg ha<sup>-1</sup>). Valores inferiores o superiores inciden negativamente en el IA del enzima. Además, con valores inferiores a 300 kg ha<sup>-1</sup> el IA de la PEPC permanece muy bajo pudiendo repercutir negativamente en el desarrollo de la raíz. En efecto, la producción de raíz de las plantas de G1 fue del orden de un 33% inferior a la de los otros grupos (gráfico 24 de Martínez et al., en este libro). También se observa que los máximos de IA de la PEPC coinciden con el máximo desarrollo foliar (gráfico 5 de Martínez et al., en este libro) y por tanto con el periodo de mayor aporte de sacarosa procedente de las hojas. En este periodo (final de Abril y Mayo), excepto en el G3, se dan los máximos valores de actividad sacarosa sintasa (Fig. 7, Jiménez et al., en este libro).

Todos estos factores analizados en su conjunto dibujan un panorama que indica que un aumento del aporte de sacarosa (máximo de hojas en Mayo) se traduce en la raíz en un aumento de la actividad de los enzimas que traducen esa sacarosa en materiales de construcción favoreciendo el crecimiento de la raíz. En este momento, y a dosis altas de nitrato, es cuando se estimula la síntesis de proteínas. Es en este punto donde la PEPC cumple una función relevante y fundamental, suministrando esqueletos carbonados extras al ciclo de Krebs cuando la demanda es muy alta, permitiendo así la incorporación del nitrato a aminoácidos y a proteínas y permitiendo el crecimiento de los órganos de la planta. Esta es la llamada "función anaplerótica" de la PEPC. Los resultados indican también que por debajo de 300 kg ha<sup>-1</sup>, la producción de raíz es menor, coincidiendo con valores bajos de IA para la PEPC durante este periodo de desarrollo.

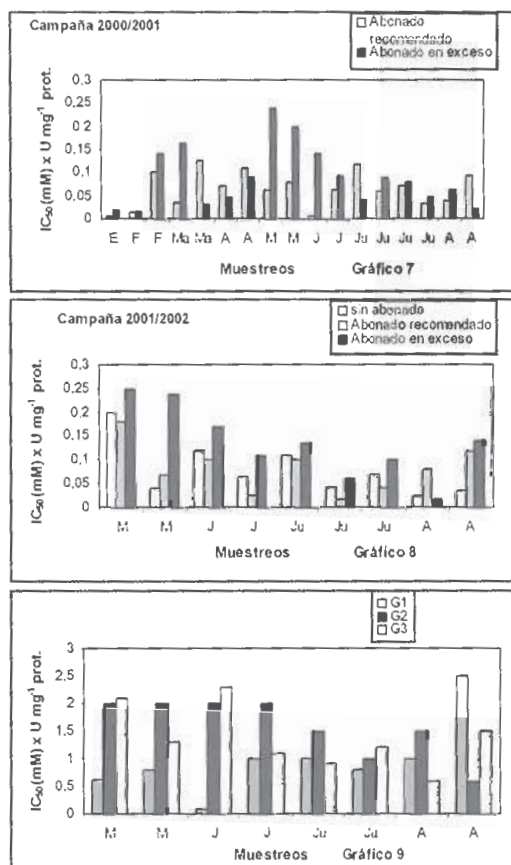


Figura 5. Índice de Actividad in vivo de la PEPC( ( IC<sub>50</sub> (mM) x U mg<sup>-1</sup> prot.) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

## **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

A partir del mes de Junio, los factores limitantes del desarrollo del cultivo vienen determinados por la edad de la planta y las condiciones de estrés del verano andaluz, y no por la disponibilidad de nitrato, mostrando los cultivos un IA para la PEPC bajo (Fig. 5, gráfico 9) ya que el crecimiento de la raíz se detiene (gráfico 24, Martínez et al., en este libro). En este periodo en que las altas temperaturas disminuyen la fotosíntesis y hay menos aporte de sacarosa de las hojas, el mantenimiento de hojas y raíces, mayores cuanto más nitrato, se hace a costa de la sacarosa acumulada en la raíz, traduciéndose en una bajada de la polarización en cultivos con exceso de nitrato (gráfico 25 de Martínez et al., en este libro).

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que a partir de Junio los valores de IA para la PEPC disminuyen, indicando que no hay excesiva competencia por los esqueletos carbonados para la síntesis de proteínas ya que el crecimiento de la raíz está detenido. En efecto, los niveles más bajos de proteínas, en relación al peso fresco, se detectan durante este periodo del cultivo (Jiménez, 2004). En esta situación se acumulan osmolitos como prolina y glicina-betaína que contribuyen a la subida de compuestos  $\alpha$ -amino. Por otro lado, la bajada de actividad de la PEPC se corresponde con una subida de la invertasa ácida (Fig. 11, Jiménez et al., en este libro) indicando que durante este periodo los esqueletos carbonados se obtienen mayoritariamente vía invertasa ácida, a partir de la sacarosa acumulada, y sin una intervención fundamental de la PEPC. En efecto, los resultados presentados en este libro muestran que la utilización de DMDP (un inhibidor de la actividad invertasa) disminuye de forma drástica la síntesis de prolina (Monreal et al., Tabla 2). Sin embargo, se necesitan trabajos posteriores para determinar la contribución exacta de la PEPC al crecimiento de la raíz y a la respuesta al estrés; en cualquier caso, nuestros resultados permiten sugerir que en la raíz de remolacha, la PEPC se vislumbra como un enzima fundamental que permite, a través de la regulación de su estado de fosforilación, conectar el crecimiento de la raíz con los periodos de máxima eficacia fotosintética, aporte de sacarosa y disponibilidad de nitrato.

### **· Evolución de la actividad PEPC y estado de fosforilación en los ensayos de campo de déficit hídrico y riego (variedad Ramona)**

El déficit hídrico en el cultivo de la remolacha contribuye a la acumulación de compuestos orgánicos de nitrógeno en la raíz, entre los que se encuentran aminoácidos y derivados como prolina y glicina-betaína, que actúan como osmolitos compatibles en el citoplasma. Estos compuestos, que se sintetizan en la hoja, se transportan a la raíz disminuyendo el potencial hídrico y aumentando su capacidad de absorber agua del suelo.

En este apartado hemos determinado la actividad PEPC y su grado de fosforilación en relación a la disponibilidad de agua de la planta para estudiar el posible papel de la PEPC en la respuesta al estrés, en las raíces de remolacha de siembra otoñal. El estudio se ha realizado en la variedad Ramona. Como índice de estrés hídrico de la planta se han utilizado los niveles de prolina (Monreal et al. en este libro).

En los gráficos 10 y 11 de la Fig. 6, se muestra la actividad específica de la PEPC de la raíz ( $U\ mg^{-1}\ prot.$ ) en los ensayos de campo, en condiciones de déficit hídrico y riego. En la campaña 2000/2001 se observa que los valores de actividad PEPC van oscilando a lo largo del cultivo y no se detectan diferencias entre las dos condiciones. Los valores de actividad más altos corresponden a  $0,06\ U\ mg^{-1}\ prot.$  (Fig. 6, gráfico 10). En la campaña 2001/2002 los valores de actividad específica de la PEPC son muy homogéneos en ambas condiciones (gráfico 11) y oscilan entre  $0,04$  y  $0,07\ U\ mg^{-1}\ prot.$  En general, se obtienen valores de actividad específica de PEPC en el mes de Mayo más bajos que en las muestras del ensayo de abonado donde se utilizó la variedad Claudia (Fig. 3, gráficos 1 y 2).

Los valores de  $IC_{50}$  para el L-malato en estos muestreos (Fig. 7; gráficos 12 y 13) presentaron diferentes tendencias en las dos campañas analizadas. En la campaña 2000/2001 los valores de  $IC_{50}$  son muy heterogéneos y no se puede establecer una relación clara entre las dos condiciones. En la campaña 2001/2002 la  $IC_{50}$  fue mayor en los ensayos

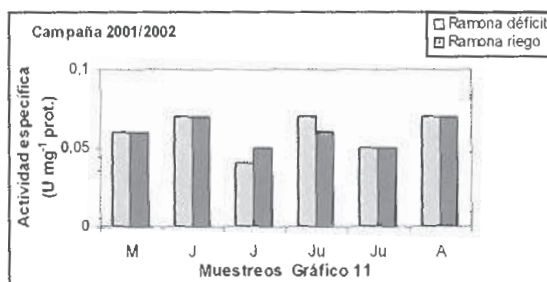
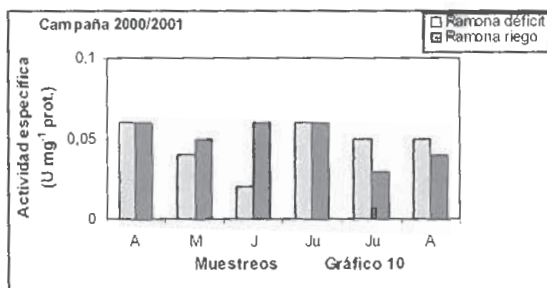


Figura 6. Actividad PEPC específica ( $U\ mg^{-1}\ prot.$ ) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

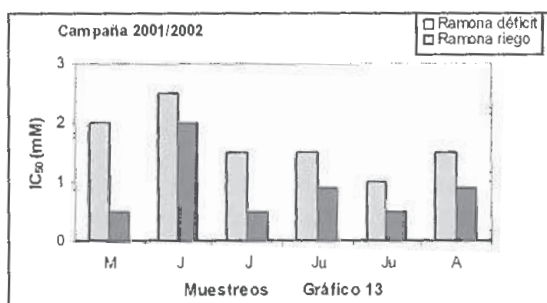
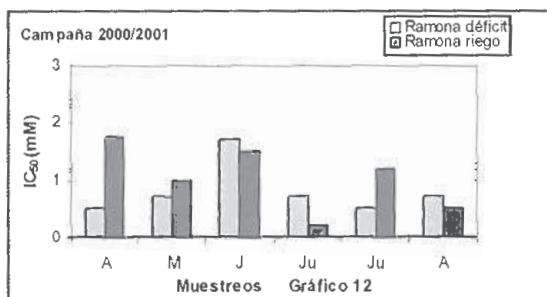


Figura 7. Sensibilidad al málico ( $IC_{50}$ , mM) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

## Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

de déficit hídrico que en los de riego, con valores de  $IC_{50}$  entre un 40 y un 50% más altos que los de las muestras de regadío (gráfico 13). Las diferentes respuestas entre las dos campañas pudo deberse a diferencias en el régimen de lluvias (Tabla 1, Morillo-Velarde, en este libro) que indican un aporte por lluvias de 367 mm para el 2001 y de 215 para el 2002, o bien al nivel de nitrógeno en planta ya que las plantas de la cosecha del 2000/2001 pertenecen al G2, mientras que las de la campaña 2001/2002 pertenecen al G3 con mayor LAI (Martínez et al., gráfico 5) y mayores pérdidas por transpiración.

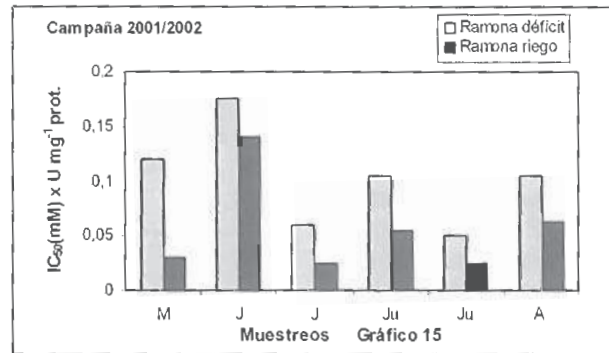
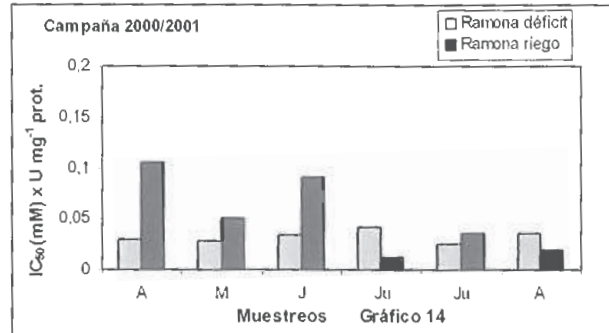


Figura 8. Índice de Actividad in vivo de la PEPC ( $IC_{50}$  (mM) x  $U\ mg^{-1}\ prot.$ ) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

Los índices de actividad *in vivo* (IA), dado que las actividades son muy homogéneas, reproducen el perfil de fosforilación del enzima (Fig. 8), con IA superiores en secano que en regadío en la campaña 2001/2002 (Fig. 8, gráfico 15). Los valores de prolina utilizados como índice de estrés nos muestran que, en efecto, los cultivos de secano padecieron un estrés hídrico superior al de regadío y acumularon más prolina en la raíz (Fig. 2, Monreal et al., en este libro). La contribución real de la PEPC a la síntesis de este osmolito en la raíz es difícil de determinar, ya que la prolina en la remolacha se sintetiza mayoritariamente en la hoja (Caballero-Valcarce et al., en este libro). Sin embargo, la PEPC puede contribuir a la respuesta al estrés ya que el malato producido puede en sí mismo acumularse y utilizarse como osmolito. En este sentido se ha visto que plantas de sorgo cultivadas en estrés salino acumulan una mayor cantidad de malato respecto a las plantas controles (Echevarría et al., 2001, García-Mauriño et al., 2003). Además, el malato es el osmolito principal de las plantas CAM (plantas crasas con fijación nocturna de  $CO_2$ ) y que representa uno de los máximos exponentes en la adaptación al estrés hídrico en el reino vegetal.

## CONCLUSIONES

- En plantas de laboratorio se muestra que la PEPC está poco fosforilada en las raíces secundarias, esta merma de actividad se ve compensada, en parte, por la abundancia del enzima. Por el contrario, en la raíz acumuladora el nitrato induce la fosforilación de la PEPC. Estos altos valores de fosforilación de la PEPC, junto con otros factores, podrían estar en la base del aumento de tamaño de las raíces bien abonadas respecto de las raíces crecidas en nitrato limitante.

- En los ensayos de campo, los máximos valores de IA para la PEPC se dan a finales de Abril, Mayo y principios de Junio, indicando una función relevante del enzima en el crecimiento de la raíz. La actividad óptima de la PEPC (determinada a pH 8) es muy similar en los diferentes ensayos de abonado, sin embargo, el nitrógeno, al igual que en los ensayos de laboratorio, aumentó el grado de fosforilación del enzima (PEPC más activa), en condiciones subóptimas de pH (7,3) y presencia del inhibidor malato ( $IC_{50}$ ), condiciones fisiológicas del citoplasma *in vivo*.

- En los meses estivales se produce una bajada del aporte de sacarosa procedente de la hoja que determinar una detención del crecimiento. Los resultados obtenidos en este trabajo establecen que este diálogo podría llevarse a cabo a través de la PEPC y de su regulación por fosforilación, manteniendo bajos los valores de IA para la PEPC y limitando el crecimiento de la raíz a pesar de la disponibilidad de nitrato.

- En situaciones de estrés hídrico, manifestado por valores superiores de prolina en secano respecto del regadío, los valores de IA para la PEPC son más altos. En estas condiciones el aumento de IA para la PEPC se establece por un aumento de la fosforilación del enzima. La contribución real de la PEPC a la síntesis de este osmolito en la raíz, es difícil de determinar, ya que la prolina, en la remolacha, se sintetiza mayoritariamente en la hoja, sin embargo, el malato producido vía PEPC puede en sí mismo acumularse y utilizarse como osmolito.

## BIBLIOGRAFÍA

**Bradford, M.M (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

**Chollet, R., Vidal, J., O'leary, M. (1996).** Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 47: 273-298.

**Echevarría C, García-Mauriño S, Alvarez R, Soler A, y Vidal J. (2001).** Salt stress increases the  $Ca^{2+}$ -independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in sorghum leaves. *Planta*, 214: 283-287.

### **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

---

Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J. (1994). The effect of pH on the covalent and metabolic control of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. *Arch Biochem Biophys.*, 315 (2): 425-430.

Echevarría, C., Vidal, J. (2003). The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol Biochem.*, 41: 541-547.

García-Mauriño S, Monreal JA, Alvarez R, Vidal J y Cristina Echevarría. (2003). Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta* , 216: 648-655

Hewitt EJ (1966). The composition of the micronutrient solution. En : "Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition" . Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux of Hort., Tech. Commum. N° 22. Farnham Royal.

Huppe, H.C., Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.*, 45: 577-607.

Jiao, J., Chollet R. (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>4</sub> and crassulacean acid metabolism plant. *Plant Physiol.*, 95: 981-985.

Jiménez-Segovia, E-T (2004). "Factores ambientales y fisiológicos que influyen en la riqueza y la calidad de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Vidal, J., Bakrim, M., Hodges, M. (2002). The regulation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation, En FOYER, C.; NOCTOR, G. *Advances in Photosynthesis; Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Metabolism*, Edotado po Kluwer Academic Publisher., 12: 135-150.