

REMOVILIZACIÓN DEL NITRÓGENO EN PLANTAS DE TRIGO COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA DE USO

Carla Caputo, M. Victoria Criado e Irma N. Roberts
IBYF (CONICET-Facultad de Agronomía-UBA)
caputo@agro.uba.ar

Información parcialmente publicada en *Plant Physiology and Biochemistry* 47(2009): 335-42.

Introducción

La concentración proteica en el grano de trigo (*Triticum aestivum* L.) es de gran interés agronómico ya que el contenido de proteínas es uno de los determinantes del precio del grano. Esto es debido a su influencia tanto en la calidad panadera como en el valor nutricional. En nuestro país, el tenor proteico descendió en las últimas décadas al límite aceptable para poder ser trigo panificable. Este descenso ocurrió principalmente debido a que se priorizó el aumento del rendimiento a expensas de la calidad, dificultando la exportación del cereal. En los últimos tiempos la fertilización nitrogenada contribuyó a ir resolviendo esta dificultad, pero trajo otros problemas. El cultivo requiere actualmente grandes dosis de fertilizantes nitrogenados, pero una alta proporción del nitrógeno (N) permanece en los rastrojos al momento de la cosecha o en el suelo. Por ello, resulta de la mayor importancia identificar los pasos limitantes en el control de la absorción, asimilación y removilización del N durante el desarrollo del cultivo, tanto para mejorar la calidad panadera de nuestros trigos, como para aumentar la eficiencia de la fertilización.

El N requerido para la síntesis de proteínas que se acumulan en el grano de trigo en desarrollo proviene mayormente de la removilización del N previamente asimilado y acumulado en las hojas. Esta removilización tiene lugar por el floema (sistema de conducción activo) mayormente en la forma de aminoácidos (Feller y Fischer, 1994). De esta forma, la eficiencia de la removilización del N desde las hojas se convierte en el principal determinante de la concentración de proteínas del grano al final del ciclo del cultivo. Pese a la importancia del tema, es muy poco lo que se conoce sobre la regulación de este proceso. Se conoce que el proceso de removilización está regulado tanto por factores internos como externos. Entre los factores internos, la familia de enzimas de la glutamina sintetasa (GS) juega un rol central en el metabolismo del N en el trigo y otros cultivos (Hirel y Lea, 2001). Numerosos estudios han sido llevados a cabo para definir cuál es la participación de cada uno de los integrantes de esta familia de enzimas (Mifflin y Habash, 2001; Bernard y Habash, 2009), pero aún no se ha podido dilucidar completamente. Por lo tanto, el conocimiento del mecanismo de regulación de GS1 (una de las isoenzimas) y su relación con el transporte de N en la planta significa un aporte de relevancia al conocimiento del metabolismo del N en trigo. Este conocimiento proporcionará una nueva herramienta para el mejoramiento de la eficiencia en el uso del N por parte del cultivo.

En las investigaciones referentes a la regulación del trans-

porte de N desde los órganos fuente (hojas) a los órganos destino (granos, por ejemplo), pudimos observar que los aminoácidos destinados al transporte por floema en las plantas jóvenes de trigo cultivadas bajo un adecuado suministro lumínico y de N provendrían del N recientemente asimilado. En cambio, en situaciones de estrés (por ej. déficit de N o falta de luz), serían los aminoácidos almacenados previamente en las hojas los que se movilizarían por el floema (Caputo y Barneix, 1997 y 1999). Por otro lado, la concentración de la mayoría de los aminoácidos encontrados en el floema es proporcional a su concentración en las hojas. Sin embargo, algunos aminoácidos resultan favorecidos mientras que otros son discriminados a la hora de ser conducidos por el sistema de conducción, sugiriendo la existencia de al menos un paso de regulación en el proceso de removilización del N en la planta (Caputo y Barneix, 1997, Caputo et al., 2001)

Materiales y Métodos

Trabajamos con plantas de trigo (*Triticum aestivum* L. var. Pro INTA Isla Verde) que sembramos en macetas con vermiculita y regamos con solución nutritiva suplementada con 10 mM KNO₃. Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo a 25°C, con un fotoperíodo de 16 h luz y una densidad de flujo de fotones de 300 μmol m⁻² s⁻¹. Cuando la tercer hoja estuvo completamente expandida (15 días), las plantas fueron sometidas por 48 hs a los siguientes tratamientos: **Control**, continuaron bajo las mismas condiciones nutritivas; **N-**, plantas regadas con solución nutritiva carente de fuente de N; **BAP**, plantas suplementadas con 20 μM BAP (hormona sintética, 6-bencilaminopurina) en la solución nutritiva; **MSX**, plantas rociadas con 5 μmol MSX/maceta (un inhibidor de la enzima GS, metionina sulfoximida); **N-/MSX**, plantas privadas de N y rociadas con 5 μmol MSX/maceta o **BAP/MSX**, plantas suplementadas con 20 μM BAP y rociadas con 5 μmol MSX/maceta. En otro ensayo, las plantas de 15 días fueron rociadas con diferentes dosis del inhibidor de GS (0, 1, 5 o 10 μmol MSX/maceta). El rociado del inhibidor se realizó 24 hs antes del muestreo en todos los casos. Se tomaron muestras de los tejidos vegetales y de los exudados floemáticos (por la técnica del EDTA). Se determinó la concentración de aminoácidos totales por el método de la Ninhidrina; la actividad enzimática de GS (según Nesselhut y Harnischfeger, 1991) y la abundancia relativa de la isoenzima GS1 por inmunodetección utilizando anticuerpos específicos. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y las comparaciones entre las medias

(5 repeticiones cada una) se realizaron por el método de Scheffé. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statistica R.

Resultados y discusión

Cuando las plantas son sometidas a cambios en sus condiciones de crecimiento, reaccionan modificando una variedad de parámetros. Nosotros observamos que al someterlas tanto a una deficiencia de N como al agregado de BAP, se producía una disminución en la cantidad de aminoácidos transportados por el floema y un aumento en la abundancia de la enzima glutamina sintetasa 1 (GS1) (Tabla 1). Entre estos dos parámetros se encontró una fuerte correlación (Figura 1), sugiriendo la participación de esta enzima en el mecanismo de regulación de la cantidad de N que viaja por el floema en las plantas de trigo. A partir de estos resultados se decidió estudiar si era posible regular el transporte de aminoácidos por el floema produciendo cambios en la actividad de GS. Para esto se rociaron las plantas con diferentes dosis de un inhibidor de esta enzima (MSX). Con este ensayo observamos que cuanto menor era la actividad de la enzima GS, mayor era la concentración

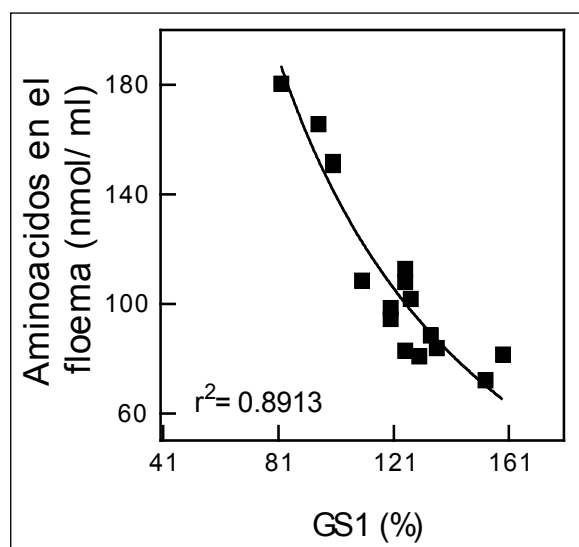


Figura 1. Correlación entre la concentración de aminoácidos en el floema y la abundancia de la enzima GS1. Cada punto representa una muestra individual analizada en la tabla 1. El r^2 indica la bondad de ajuste de la regresión que utiliza como ecuación al inverso de X.

de aminoácidos movilizados al floema (Figura 2). También observamos que cuando se trató con MSX a las plantas sometidas a deficiencia de N o al agregado de BAP, la cantidad de aminoácidos transportados por el floema no se encontraba inhibida (Tabla 1). Esto estaría indicando que los cambios en el transporte de aminoácidos por floema

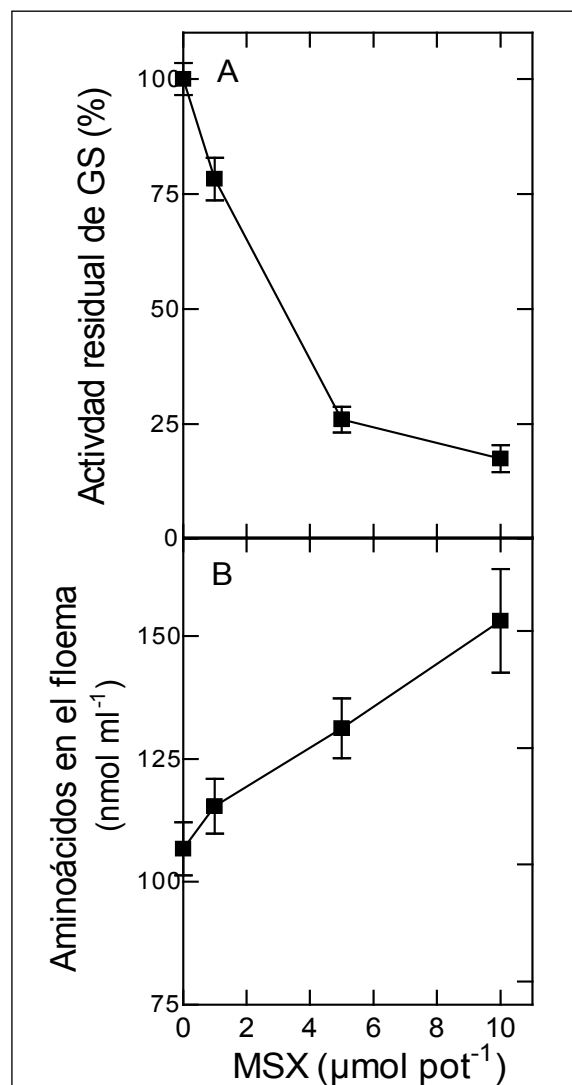


Figura 2. Variación de la actividad enzimática total de GS y de la tasa de pasaje de aminoácidos al floema en función de diferentes dosis del inhibidor de la enzima. Cada valor es la media \pm error estándar de 5 repeticiones.

Tabla 1: Variación de la actividad enzimática total de GS, la abundancia relativa de la isoenzima GS1 y la tasa de pasaje de aminoácidos al floema en función de diferentes condiciones de cultivo. Distintas letras indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$).

Tratamientos	Actividad GS		Expresión GS1		Aminoácidos en floema	
	(%)		(%)		(nmol ml ⁻¹)	
Control	100	A	100	C	172.5	B
N-	79.9	B	126	B	112.2	C
BAP	102.2	A	172	A	126.4	C
MSX	32.5	C	ND		213.3	A
N-/MSX	29.8	C	ND		175.1	B
BAP/MSX	23.6	C	ND		226	A

ocurridos en las plantas con deficiencia de N o suplemento de BAP se encuentran regulados por el cambio de actividad de la enzima GS1.

El aumento de la actividad de la enzima GS1 trae aparejado un incremento de la concentración del aminoácido glutamina y una disminución de glutamato, lo que altera el balance entre ellos dentro de la hoja (datos no mostrados). El glutamato es el aminoácido más abundante en el floema de las plantas de trigo en el estado vegetativo (Caputo y Barneix, 1997), mientras que la glutamina es el aminoácido que predomina durante la etapa de llenado del grano (Simpson y Dalling, 1981). En conjunto, estos conocimientos nos llevan a sugerir que la enzima GS1 actuaría como represora del transporte de compuestos nitrogenados en la etapa vegetativa, y contrariamente como promotora en la reproductiva. Este efecto promotor tendría una consecuencia positiva en la acumulación de proteínas en el grano. De hecho, estudios sobre el comportamiento de plantas de trigo transgénicas que presentan una mayor actividad de GS1 en hojas mostraron una mayor capacidad para acumular N en el grano que cultivares tradicionales (Habash et al., 2001).

Conclusión

El estudio de la acción de la enzima glutamina sintetasa 1 (GS1) permite avanzar en el conocimiento de los factores internos y externos que afectan la dinámica del N y el contenido de proteínas en el grano de trigo, e incluye a la manipulación de esta enzima como una nueva herramienta para aumentar la removilización del N en el cultivo de trigo.

Bibliografía

- Bernard, S.M. y D.Z. Habash.** 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytology* 182:608-620.
- Caputo, C. y A.J. Barneix.** 1997. Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiologia Plantarum* 101: 853-860.
- Caputo, C. y A.J. Barneix.** 1999. The relationship between sugar and amino acid export to the phloem in young wheat plants. *Annals of Botany* 84: 33-38.
- Caputo, C., N. Fatta y A.J. Barneix.** 2001. The amino acid export to the phloem is altered in wheat plants lacking the short arm of chromosome 7B. *Journal of Experimental Botany* 52(362): 1-8.
- Feller, U. y A.M. Fischer.** 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Review of Plant Science* 3:241-273.
- Habash, D.Z., A.J. Massiah, H.L. Rong, R.M. Wallsgrove y R. Leigh.** 2001. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology* 138: 83-89.
- Hirel, B. y P.J. Lea.** 2001. Ammonium assimilation. En: P.J. Lea, J.F. Morot-Gaudry (Eds.), *Plant Nitrogen*, INRA Springer-Verlag Inc., Berlin, 2001, pp. 79-99.
- Miflin, B.J. y D.Z. Habash.** 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53:979-987.
- Nesselhut, T. y G. Harnischfeger.** 1981. Characterization of glutamine synthetase from *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 51: 329-334
- Simpson, R.J. y M.J. Dalling.** 1981. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* 151:447-456. ■

CONGRESOS, CURSOS Y SIMPOSIOS

Esta sección presenta eventos futuros en el ámbito regional e internacional que pueden ser de interés para los lectores

1

Soil organic matters - Reunión de Materia Orgánica Rothamsted Research

Lugar y fecha: Harpenden, Inglaterra, Reino Unido. 23-25 Junio 2009.

Información: <http://www.rothamsted.ac.uk/bbsrc/Research/SoilOrganicMatters/>

VII Reunión Científico Técnica de Biología del Suelo y Fijación Biológica del Nitrógeno (REBIOS 2009)

Lugar y fecha: Centro Cultural Eugenio Flavio Virla (Universidad Nacional de Tucumán), San Miguel de Tucumán, Argentina. 1-3 Julio 2009.

Información: chbellone@yahoo.com.ar

XI Simposio Internacional de Análisis de Suelos y Plantas

Lugar y fecha: Santa Rosa, California, EE.UU. 20-24 Julio 2009.

Información: <http://www.isspa2009.com>

XVII Congreso Nacional de AAPRESID

Lugar y fecha: Rosario, Santa Fe. 18-21 Agosto 2009.

Información: www.aapresid.org.ar

Congreso Chileno de la Ciencia del Suelo

Lugar y fecha: Chillan, Chile. 24-26 Agosto 2009

Información: www.schcs.cl/

Simposio Nacional de Agricultura

Lugar y fecha: Paysandú, Uruguay. 17-18 Septiembre 2009

Información: Estación Experimental "Dr.Mario A.Cassinoni" (FAGRO) - www.eemac.edu.uy

XIII Congreso Forestal Mundial 2009

Lugar y fecha: Buenos Aires, Argentina. 18-25 Octubre 2009.

Información: www.cfm2009.org

XVIII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo

Lugar y fecha: San José, Costa Rica. 16-20 Noviembre 2009.

Información: www.clacs2009.com

VI Congreso Internacional de Ingeniería Agrícola - CIACH 2010

Lugar y fecha: Chillan, Chile. 11-13 Enero 2010.

Información: www.udec.cl/ciach - ciach@udec.cl

XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo

"El Suelo, Pilar de la Agroindustria en la Pampa Argentina"

Lugar y fecha: Rosario, Santa Fe. 31 Mayo - 4 Junio 2010.

Información: www.suelos.org.ar

XIX Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo

Lugar y fecha: Brisbane, Australia. 1-6 Agosto 2010.

Información: www.19wcsc.org.au