



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

BIOLOGIAKO GRADUA

GRADU AMAIERAKO LANA

CO₂ eta lehortearen eragina *Trifolium pratense* L. eta *Agrostis capillaris* L., larreko bi espezieen nitrogeno metabolismoan

Maddi Arzak Erzibengoa

Leioa, 2013ko uztaila

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

LABURPENA

Lan honen helburua CO₂ kontzentrazioak eta lehorteak *Trifolium pratense* L. (Tp) eta *Agrostis capillaris* L. (Ac) espezieen nitrogeno metabolismoan zuten bakarkako eta beraien artean eman daitekeen elkarrekintzaren eragina aztertzea zen. Horretarako, landareak ingurumeneko CO₂ kontzentrazioan (400 ppm) eta kontzentrazio altuetan (700 ppm) hazi ziren eta lehorte baldintzatan mantendu ziren 16 egunez. Egun horien ondoren, CO₂ eta lehortearen eragina aztertu zen, Nitrato erreduktasaren aktibitate erreala (NR_{akt}) eta maximoa (NR_{max}), Glutamina sintetasaren aktibitatea (GS), Glutamato deshidrogenasaren aktibitate aminatzailea (NADH-GDH) eta desaminatzailea (NAD-GDH) eta proteinen edukia neurtuz, bi espezien hostoetan. Tp-n CO₂-arekiko aklimatazioa ikusi zen, NO₃⁻ erredukzioan batez ere, baina NH₄⁺ asimilazioa murriztu egiten zen CO₂ altuetan, fotoarnasketaren murrizpenaren ondorioz emandako GS-ren aktibitatea jaitsiz. Hala ere, NADH-GDH entzimaren aktibitatearen emendioak bukaerako proteinen kontzentrazio hainbeste ez jaisten lagundu zuen. Lehorteak ere eragina zuen CO₂ altuak eragindako murrizpen horiek handituz. Ac-ren kasuan, CO₂-aren eragina nitrogenoaren metabolismoaren lehenengo zatian, NO₃⁻ erredukzioan, ikusi zen batez ere eta lehortearena NH₄⁺-aren asimilazioan. Baina azken honetan ematen ziren desberdintasunak ez ziren nabariak eta ez zuten azaltzen proteinen edukian behatutako desberdintasunak. Beraz, NO₃⁻ erredukzioan ematen den lehortea eta ingurumeneko CO₂ kontzentrazioaren arteko elkarrekintzak sortzen zuen nitrogeno metabolismoaren murrizpena Ac-n..

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the response of nitrogen metabolism to drought, CO₂ concentration and to interaction between them. The plants were grown under ambient (400 ppm) and elevated (700 ppm) CO₂ conditions and were subjected to drought stress for 16 days. The effects of drought and CO₂ condition were analysed at the end of the drought period, determining, actual (NR_{akt}) and maximum (NR_{max}) nitrate reductase, glutamine synthetase (GS) and aminant (NADH-GDH) and desaminant (NAD-GDH) glutamate dehydrogenase activity, and the protein content, in leaves of both species. In Tp was observed an acclimation to CO₂, especially in the reduction of NO₃⁻. However, in the assimilation of NH₄⁺ the elevated CO₂ decreased GS activity, as a consequence of the reduction of photorespiration. Nevertheless, the lowering of the protein concentration was not as high as expected, due to increased activity of NADH-GDH. Drought increased the effect of CO₂, decreasing even more the GS activity and thus the protein content. In Ac, the effect of CO₂ was noted especially in the reduction of NO₃⁻ and the drought effect in the assimilation of NH₄⁺. In the second one, differences between treatments were low, so they didn't explain the differences in protein

content. Therefore, the interaction that occurs in the reduction of NO_3^- , between ambient CO_2 and drought was the reason to explain the decrease of N metabolism in Ac.

SARRERA

Azken aldian aldaketa klimatikoaren inguruan eginiko lanek zenbait aldaketa aurreikusi dituzte, landareen fisiologian eragina izan dezaketenak. Hauetako bat atmosferako CO_2 -aren kontzentrazioaren emendio litzateke, zeina gaur egun 400 ppm inguruan dagoen baina XXI. mendearen bukaerarako 700-750 ppm-ra iritsi daitekeen (Prentice *et al.*, 2001). Gainera, aurreikusitako hipotesietako bat aldaketa klimatikoaren ondorioz munduko batz besteko tenperaturaren emendioa eta prezipitazioen banaketaren eta intentsitatearen aldaketa dira. Honek, leku batzuetan lehortze baldintzak gogortzea eta luzatzea suposatuko luke, lurzoruko egoera hidrikoa aldatuz.

Biomasaren emendiorako C konposatutuez gain garrantzitsua da nitrogenodun konposatuen kantitate egokia izatea, nitrogenoaren metabolismoaren bidez lortzen direnak. Izan ere, nitrogenoa elementu esentziala da eta landareek hazkuntza eta garapen egokia izan dezaten, mantendu beharreko C:N proportzioa zehatza behar dute (Taiz & Zeiger, 2011). Izan ere, landareen zeluletan garrantzitsuak diren konposatu biokimiko askok nitrogenoa dute, adibidez, azido nukleikoen edo proteinen parte diren nukleotido eta aminoazidoek (Taiz & Zeiger, 2011). Gainera, nitrogenoaren metabolismorako erabiltzen den energia eta karbonodun eskeletoak fotosintesian lortutakoak dira, beraz, metabolismoko bi bide hauek askotan elkar erregulatzen dute eta estresarekiko nahiko sentikorak dira (Foyer *et al.*, 1998).

Landareen nitrogeno iturri nagusia lurzoruan eskuragarri dagoen nitratoa (NO_3^-) izango da, eta hau, kasu askotan, landareen hazkuntza mugatzen duen elementua izaten da (Taiz & Zeiger 2011). Landareen NO_3^- eskuratzeko gaitasuna, lurzoruan eskuragarri dagoen nitrogeno eta landarearen xurgatzeko eta asimilatzeko gaitasunaren arabera izango da. NO_3^- garraiatzaileen bidez sartuko da eta amoniora (NH_4^+) erreduzituko da, nitrato erreduktasa (NR) eta nitrito erreduktasa (NiR) entzimen erreakzio kateatuaren ondoren, lehenengoa zitosolean eta bigarrena plastidio/kloroplastoan. Ondoren, NH_4^+ glutamina bihurtzen da, glutamina sintetasaren (GS) bidez eta glutamatora ondoren, glutamato sintasarekin (GOGAT) (Ireland & Lea, 1999). Bi entzima hauen konbinaketa da amonioaren asimilaziorako bide nagusia, izan ere, GS-ak molekula honekiko afinitate handia du eta kontzentrazio txikietan (Km 2-50 $\mu\text{mol NH}_4^+$) asimila dezake. Baina bide hau estresaren ondorioz inhibituta egonez gero, glutamato deshidrogenasaren (NADH-GDH) bidezko aminazioa erabiltzen da (Oaks, 1995), zeinak afinitate txikiagoa (Km 7-100 $\mu\text{mol NH}_4^+$) duen eta ondorioz kontzentrazio altuak direnean bakarrik asimilatuko duen. Hala ere, entzima honek kontrako norabidean ere funtziona dezake (NAD-GDH), desaminazioa burutuz. Bide hau, seneszentzian (NH_4^+ traslokatzeko) edo C iturria

murriztean energi lortzeko karbonodun eskeletoen iturri bezala erabiltzen dela ikusi da (Robinson *et al.*, 1991).

Atmosferako CO₂ kontzentrazioaren igoerak C asimilazio tasaren emendio ekarriko du (Bowes, 1993). Izan ere, gaur egungo kontzentrazioak mugatu egiten du prozesu hau C₃ landareetan eta ondorioz hainbat prozesutan eragina izango du, fotosintesi-tasa emendatuz eta transpirazio murriztuz, uraren erabileraren efizientzia handitzen baitu. C asimilazioa handitzean, karbonodun eskeleto gehiago ekoiztuko da eta hauen hidrolisiaz energia. Landareak energia hori beste zenbait prozesutara bidera dezake, hala nola, nitrogenoaren metabolismora. Horrela, lurzoruko nitrogeno ioien xurgapenerako edo entzimetako erreakzioetarako beharrezko energia eta substratuen kontzentrazioa emendatu dezake. Hala ere, oraindik ez dago oso argi zein den CO₂-aren eragina hostoen nitrogeno metabolismoan (Stitt & Krapp, 1999), ez baitu modu zuzenean eragiten. Gainera, CO₂ igorpenak eragin desberdina daukela ikusi da ingurumen baldintza desberdinetan, garapen etapa desberdinetan eta baita espeziearen arabera ere (Bazzaz, 1990; Ward & Strain, 1999; Jablonski *et al.*, 2002; Poorter & Navas, 2003).

Lehorreak landareen transpirazio murriztuko du eta hori gertatzeko hainbat mekanismo jartzen dira martxan (Lawlor & Cornic, 2002). Hala, konduktantzia estomatikoa murrizten dute ahalik eta ur galera txikienak izan ditzaten. Honek, gas elkartrukea murriztuko du, C asimilazio ere murriztuz (Tezara *et al.*, 1999). Ondorioz, karbonodun eskeletoak eta hauen bidez lorturiko energia murriztu egingo da. Aldi berean, nitrogenoaren metabolismoan kalteak sortuko ditu Heckathorn *et al.*, 1997), hala nola, prozesuan parte hartzen duten entzima batzuen aktibitate zuzenean mugatuz (Urabe *et al.*, 2010) edo nitratoaren xurgapena, NO₃⁻-aren erredukzioa eta NH₄⁺ asimilazioa murriztuz, azkenean, aminoazido eta proteinen sintesia kaltetuz.

CO₂ eta lehorrea batera agertzen diren hainbat kasutan lehorreak eragindako fotosintesiaren murrizpen CO₂ kontzentrazio altuak konpentsatzen duela ikusi da (Robredo *et al.*, 2011). Izan ere, nahiz eta estomak itxiagoak egon, ingurunekeo CO₂ kontzentrazioa altuagoa denez, C:O handitu egingo da eta Errubiskoak karbono eskuragarri gehiago duenez karbonoaren finkapenaeen efizienteagoa bihurtuko da, fotoarnasketa murriztuz. Orain arte egindako ikerketetan, bi ingurumen eragile hauen inguruan ateratako emaitzak nahiko kontrajarriak direnez (Robredo *et al.*, 2011), CO₂ kontzentrazioaren eta lehorrearen artean elkarrekintzarik dagoen eta bakarka duten eraginarekiko desberdina den aztertzea da lan honen helburua. Kontuan hartuta gizakiaren eraginez lurrazalaren estalduraren zati handi bat larreak direla, ekosistema horretan ugarien diren familietako espeziekin egin da lan, fabazeo; *Trifolium pratense* L. (Tp) eta gramineo batekin; *Agrostis capillaris* L. (Ac).

MATERIAL ETA METODOAK

Landareen hazkuntza

Esperimentua Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Landareen Biologia eta Ekologia Saileko Landare Fisiologiako laborategian burutu zen. Horretarako, larreko bi espezie erabili ziren, *Trifolium pratense* L. (Tp) eta *Agrostis capillaris* L. (Ac). Hauen haziak 6 litroko bolumeneko, 21.5 cm-ko diametroko eta 19 cm-ko altuerako lorontzietan erein ziren, turba bermikulita nahasketazko (1:1 v/v) substratua erabilia. Substratua ur distilatuarekin garbitu zen egon zitezkeen zikinkeriak kendu eta materiala homogeneizatzeko. Lorontzi bakoitzean espezie bateko 12 ale landatu ziren eta txandako 6 lorontzi jarri ziren. Landareak Conviron E15 (Conviron, monitoba, Canada) baldintza kontrolatuko hazkuntza kamaretan hazi ziren, ondorengo baldintzetan, fotoperiodoa (14h eta 10h) egun/gau, bataz besteko tenperatura 24/20° C eta %70/%80-ko hezetan erlatiboan. Argi intentsitatea 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ izan zen, lanpara floreszente (Sylvania. F48T125HO/VHO) bidez. Landareak ingurumeneko CO₂ kontzentrazioan 400 ppm-tan (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) eta 700 ppm-tan (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) hazi ziren, kontzentrazio bakoitzeko 2 txanda eginaz. Bi tratamenduak txandaka egin ziren eta kamara berdina erabili zen, kamara desberdinek eragin zitzaketan aldaketak saihestuz (Alonso *et al.*, 2009). Gainera, lorontzien posizioa kamara barruan zoriz aldatzen zen astero, posizioaren aldakortasun hori ere saihesteko (Hymus *et al.*, 2001).

Tratamenduak eta diseinu esperimentalak

Erein zirenetik lehorte tratamendua hasi arte, astelehen eta ostiraletan Hoagland soluzioarekin (Arnon & Hoagland, 1940) ureztatu ziren eta asteazkenetan ur distilatuarekin. Esan bezala, esperimentua 4 txandatan egin zen, kontuan hartuz CO₂ kontzentrazioa, hau da, bi txanda 400 ppm-tan eta beste bi 700 ppm-tan, bakoitzean sei lorontzirekin. Horietatik hiruri lehorte baldintzak aplikatu zitzaizkien eta beste hiru kontrol moduan erabili ziren. Horretarako, hazkuntza kamarari loturiko gasen nahasketarako aparatua erabili zen (Gas Monitor ADC 2000 Series, ELE Internacional). Baldintza hauek konstante mantentzen ziren kamara barruan esperimentu osoan zehar.

Lehorte tratamendua erein eta 28 egunetara hasi zen eta hortik aurrera egunero ureztatu zen, astelehen, asteazken eta ostiraletan Hoagland erabilia eta astearte eta ostegunetan ur distilatua. Uzta eguna zehazteko substratuaren edukin bolumentrikoa (ur bolumena/substrato bolumena) hartu zen kontuan. Espezie bakoitza kontrol eguneko (lehorte tratamendua hasteko eguna) substratuaren edukin bolumentrikoaren %15-era zein egunetan iristen zen kalkulatu zen. Tp-ak ur gehiago behar zuenez, lehenago pairatzen zuen lehorte eta beraz, lehenago iristen zen %15 horretara. Beraz, aztertu ziren bi espezieetan lehortearen efektua berdina izan zedin, Ac kontrol egunaren %15-era iristen zen eguna hautatu zen uzta egun bezala, lehorte hasten

zenetik 16 egunetara. Hala, kontrolei ebapotranpirazioan galdutako uraren %100 itzultzen zitzairen eta lehortekoak ez ziren ureztatzen kontroleko pisuaren %15ra iristen ez baziren.

Entzimen erauzketa eta aktibitatearen determinazioa

Entzimen aktibitatea determinatzeko, uzta egunetan bildutako hostoak nitrogeno likidotan ehotu ziren, ehotzeko makinaren bidez (Model MM301, Fisher Bioblock Scientific). Hala, entzima bakoitzaren determinaziorako ehotutakotik lagin bat hartu zen.

NR aktibitatea determinatzeko Abd-El Baki *et al.* (2000) erabilitako metodoa jarraitu zen, zeinak aktibitatea nitritoaren agerpenaren bidez neurtzen zuen. Izoztutako lagin bakoitzetik 3 espatulakada hartu eta erauzketa tanpoiaren (100 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 20 mM MgCl₂, 5 mM ditiotreitol (DTT), 10 µM flabin adenin dinukleotido fosfata (FAD), 10 µM leupeptina, 0.2 mM fenilmetilsulfonil flourra (PMSF), 0.01mM Pefabloc, 3 espatula polibinilpolirrolidenoa (PVPP), %0.05 kaseina) 850 µl bota zitzaizkion. Laginak ehotu (3 minutu) eta 12 minutuz zentrifugatu (4°C; 16000g) ziren. Bi neurketa egin ziren NR-an, aktibitate erreala (NR_{akt}) eta aktibitate maximoa (NR_{max}), aktibazio egoera zein zen ikusteko. Horretarako, bi erreakzio tanpoi desberdin egin ziren, lehenengoari Mg²⁺ gehituz eta bigarrenari azido etildiaminotetraazetikoa (EDTA). Zentrifugatutako gainjalkinetatik erreakzio bakoitzarentzat 50 µl hartu eta erreakzio tanpoiaren (50 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 10mM KNO₃, 0.5 mM NADH, 10 µM FAD, 1 mM DTT, eta 20 mM MgCl₂ edo 20 mM EDTA) 250 µl bota zirenean hasi zen erreakzioa. 30 minutuz 30°C-ko bainuan inkubatu ondoren 32 µl zink azetato (500 mM) bota zitzairen, erreakzio gera zedin. 5 minutuz zentrifugatu ziren (4°C; 16000g), proteinak prezipitatzeko, eta gainjalkina (200 µl) beste mikrotubu batzuetara pasa zen. Lagin bakoitzari 2,1 µl fenazina metasulfatoa (PMS) gehituko zitzairen, entzimak oxidatu gabeko NADH oxidatzeko. 20 minutuz ilunpean eduki ondoren, sortutako nitritoari kolorea emateko %1 sulfanilamida 3M HCl-ren 160 µl bota zitzaizkion, medio azidoa sortzeko eta ondoren NEDA % 0,02-ren kantitate berdina gehituko zitzaion (160 µl). 5 minutu itxaron ondoren, espektrofotometroan laginen absorbantzia neurtu zen, 546 nm-tan. Lagin bakoitzean zuria (zink azetatoa erreakzio tanpoia baino lehen botaz) egin zen eta baita neurketetarako nitrito patroia (1 µM KNO₂).

GS, NADH-GDH eta NAD-GDHren aktibitatea neurtzeko erauzketa tanpoiaren (50 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 5mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, %20 glizerola, 2 espatula PVPP) 850 µl bota zitzairen izoztutako laginei (2 espatula). 3 minutuz ehotu eta ondoren 30 minutuz zentrifugatzen utzi ziren (4°C; 16000g).

GS aktibitatea neurtzeko Lacuesta *et al.* -ek (1990) erabilitako metodoa jarraitu zen (zenbait aldaketarekin) eta γ-GHM (glutamato-γ-monohidroamatoa) agerpena neurtu zen. Erreakzio medioak 150 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 150 mM glutamato, 10 mM MgCl₂, 15 mM

ATP, 10 mM NaOH, 10 mM Hidroxilamina eta 2 mM EDTA zeuzkan. Erreakzioa 45 µl lagini 105 µl tanpoi botatzean hasi zen eta 30 minuturen ondoren gelditze nahasketaren 150 µl (%3.3 FeCl₃, %8 Azido trikloroazetikoa (TCA) eta HCl 2 M) gehitzean bukatu. 5 minutuz zentrifugatu eta 200 µl hartu ziren, 540 nm uhin luzeran zuten absorbantzia neurtzeko espektrofotometroaren bidez. Lagin bakoitzean zuria (glutamatorik gabea) eta neurketarako γ-GHM patroia ere egin ziren.

NADH-GDH aktibitatea neurtzeko González-Moro *et al.* -ek (1993) proposatutako prozedura erabili zen. Erreakzio medioa (Tris-HCl 100 mM, pH 8, amoniosulfatoa ((NH₄)₂SO₄) 150 mM, 13 mM α-zetoglutaratoa, 0.25 mM NADH eta 1mM CaCl₂) 35° C-tan inkubatu zen. Erreakzioa hasteko 20 µl lagin eta 280 µl tanpoi nahastu ziren (zuriaren kasuan (NH₄)₂SO₄ gabekoa) eta 10 minutuz jarri ziren absorbantzia neurtzen 30 segundoro 340 nm uhin luzeran. Neurketetarako NADH patroia egin zen.

NAD-GDH aktibitatea determinatzeko Turano *et al.* -ek (1996) erabilitako metodoa jarraitu zen. Erreakzio medioa (100 mM Tris-HCl (pH 9), 0.25 mM NAD, 50 mM Na-glutamato eta 1 mM CaCl₂) 35° C-tan inkubatu zen 5 minutuz. Erreakzioa hasteko 20 µl lagin 280 µl tanpoiarekin nahastu ziren (zuriaren kasuan Na-glutamatorik gabeko tanpoia) eta espektrofotometroan sartu ziren 10 minututan zehar 30 segunduro 340 nm-tako absorbantzia neurtzeko. Kasu honetan aurreko entzima berdina zenez, ez zen patroia berririk egin behar izan. Proteinen edukia Bradford (1976) metodoaren bitartez zehaztu zen, bobina seroalbumina erabiliz zuzena egiteko.

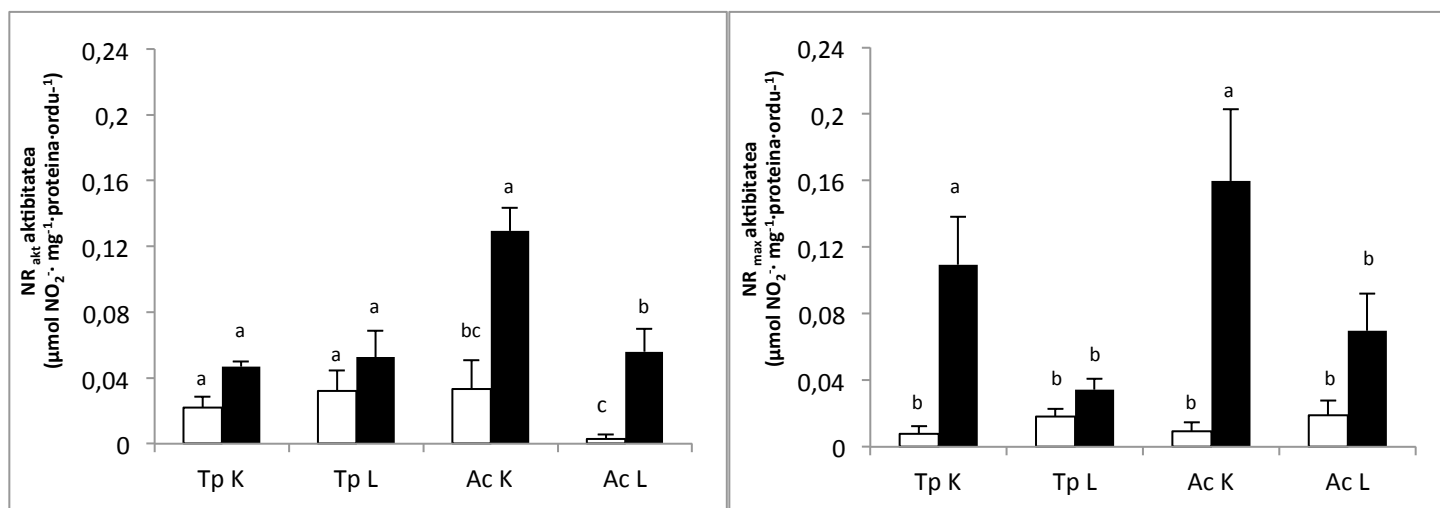
Emaizten analisia

Analisi estatistikoak SPSS programarekin burutu ziren. Neurtutako entzimen aktibitatean hautatutako parametroek, CO₂ kontzentrazioa eta lehorrea, zuten eragina ikusteko analisi unibariantea (ANOVA) egin zen eta ondoren desberdintasun horiek zein tratamenduen artean ematen ziren ikusteko Duncan Post Hoc-a erabili zen, p< 0.05 zenean estatistikoki esangarria zela kontsideratuz.

EMAITZAK

NR_{akt} aztertzean Tp-n ez zen inongo erlazio esangarririk behatu CO₂ edo lehorrea eragindakoa. Ac-n aldiz, biek eragiten zuten desberdintasuna, CO₂; p< 0.001 eta lehorreak; p= 0.001 (1.Irudia). Ac-n 700 ppm-tan hazitako landareek NR_{akt} aktibitate altuagoa zuten eta lehorreak aktibitatea murrizten zuen. Nahiz eta bazirudien lehorreak CO₂-ak eragindako efektua murrizten zuela, ez zen desberdintasun esangarririk aurkitu.

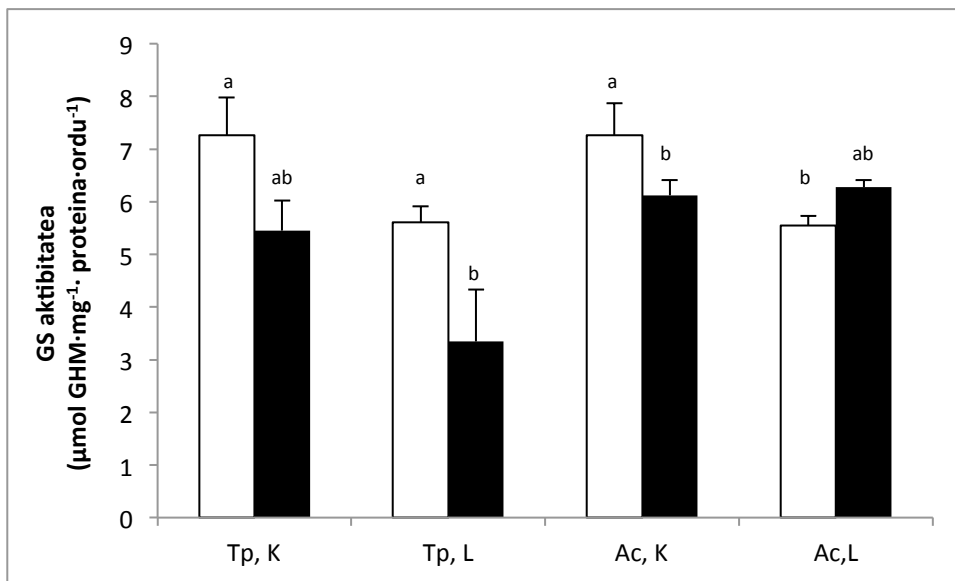
NR_{max} aktibitatean ordea Tp-n CO₂-ak bazuen eragina (p< 0.001), baita lehorreak ere (p= 0.010). 700 ppm-tan hazitako landareek aktibitate altuagoa zuten 400 ppm-takoek baino eta 700 ppm-tan eta lehorrea pairatu zuten landareek aktibitate baxuagoak zituzten, kontrolekoak baino (2.Irudia) baina 400 ppm-takoek ez. Baina bi faktoreen elkarrekintza zela eta (p= 0.001), 700 ppm-tan eta lehorrean zeuden landareen balioak murriztu egiten ziren, aktibitatea, 400 ppm-tan zeuden landareen mailaraino murriztuz. Ac-ren kasuan, CO₂-ak eragin esangarria zuen NR_{max}-an, 700 ppm-koek aktibitate altuago zutelarik, baina lehorreak ez zuen desberdintasunik sortzen. Hala ere, zuzenean eragin ez arren, CO₂-arekin elkarrekintza esangarria zuenez (p= 0.026) CO₂ kontzentrazio altuek eragindako aktibitate desberdintasuna murrizten zuen, lehorreko tratamenduak. Beraz, 700 ppm-tan eta ondo ureztatutakoetan bakarrik ikusten zen aktibitatearen emendio esangarria.



1.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen NR_{akt} aktibitatea, ondo ureztatuak (K) eta lehorreko tratamenduak (L), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza).

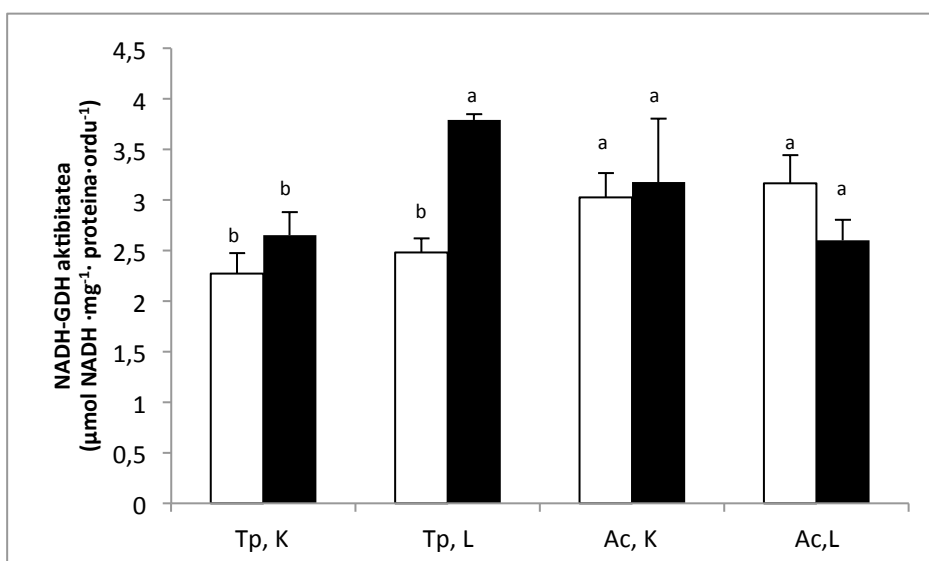
2.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen NR_{max} aktibitatea, ondo ureztatuak (K) eta lehorreko tratamenduak (L), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza).

GS aktibitatean desberdintasunak ikusi ziren bi espezieen artean. Tp-n, CO₂-ak desberdintasun esangarria eragiten zuen (p= 0.012), baita lehorreak ere (p= 0.019), 400 ppm-tan eta lehorrean 700 ppm-tan eta lehorreko landareetan baino aktibitate handiagoak zeuzkaten (3.Irudia). Hasiera batean, bi faktoreen arteko elkarrekintza egon zitekeela zirudien arren, ez zen estatistikoki esangarria. Ac-ren kasuan, lehorreak bakarrik eragiten zion (p= 0.046), lehorreko landareek aktibitate baxuagoa baitzuten. Hala ere, ondo ureztatutako landareen kasuan desberdintasun esangarriak azaltzen ziren arren, 400 ppm-tan eta 700 ppm-tan hazitakoetan artean, lehorreko baldintzetan ez zen halakorik ikusten. Izan ere, bi faktoreen arteko elkarrekintzak (p= 0.021) lehorrean izan beharko lukeen GS aktibitatea emendatu egiten zuen 700 ppm-tan hazitako landareetan.



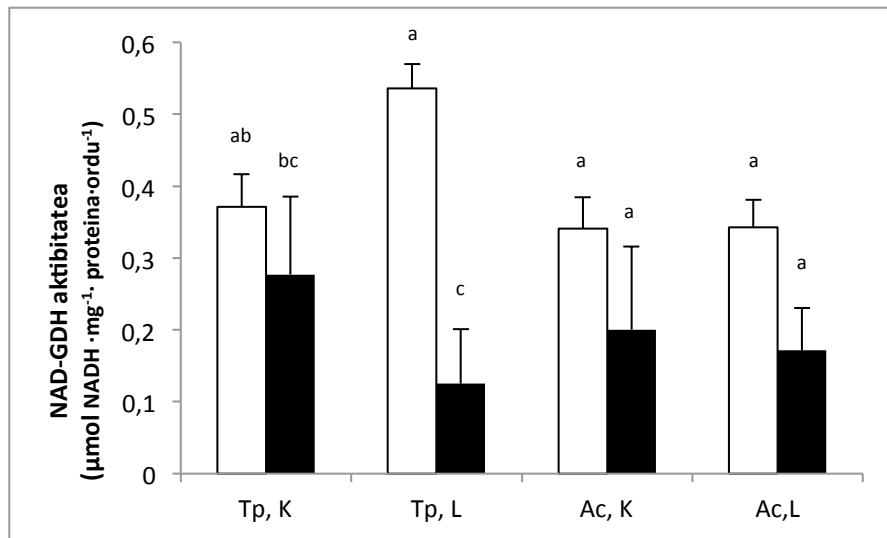
3.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen GS aktibitatea, ondo ureztatuak (K) eta lehorteko tratamendukoak (L), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza).

Tp-ren kasuan, CO₂-ren ($p < 0.001$), lehortearen ($p = 0.002$) eta bien elkarrekintzaz ($p = 0.019$) sortutako desberdintasunak ikusi ziren NADH-GDH-n (4.Irudia). 700 ppm-tako landareek aktibitate altuagoa zuten 400 ppm-takoek baino, baita lehorteko tratamendukoek ondo ureztatutakoek baino. Baina faktoreen elkarrekintza zegoenez, 700 ppm-tan eta kontroleko baldintzetan zeuden aleek 700 ppm-tan eta lehortean zeudenek baino aktibitate baxuagoa zuten. 400 ppm-tan hazitako landareetan aldiz, antzeko aktibitatea zegoen, elkarrekintzaren ondorioz. Ac-n ez CO₂-ak ezta lehortek ere ez zuten desberdintasun esangarririk sortzen entzima honen aktibitatean.



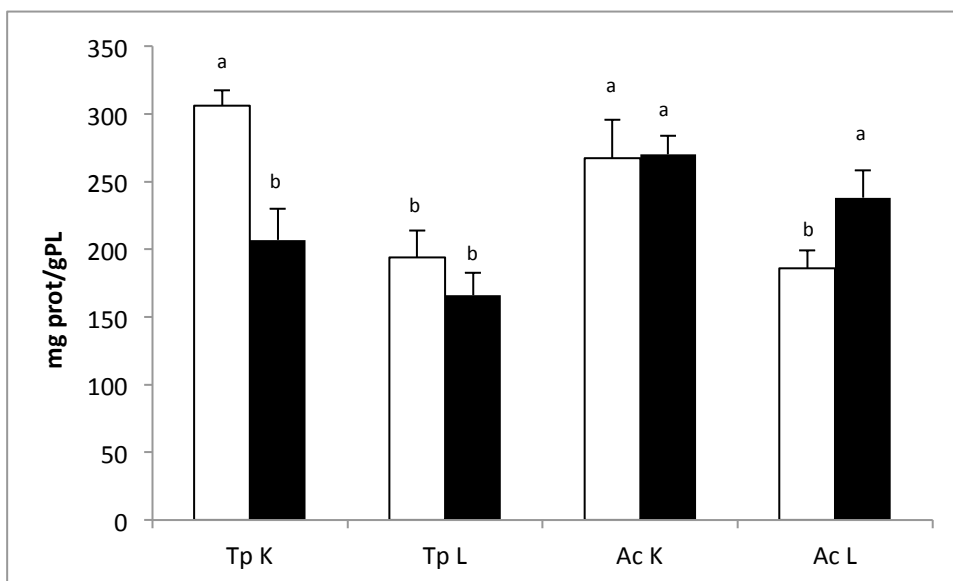
4.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen NADH-GDH aktibitatea, ondo ureztatuak (K) eta lehorteko tratamendukoak (L), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza).

Tp-n CO₂ kontzentrazio altuak NAD-GDH entzimaren aktibitatea murrizten zuen (p= 0.004), hala eta guztiz ere, CO₂ eta lehorteko baldintzen arteko elkarrekintza dela eta (p= 0.048), lehortekoetan desberdintasuna esangarria zen baina kontrolekoetan ez (5.Irudia). Hau da, lehorteak 700 ppm-tan ematen den entzimaren aktibitatearen murrizpena areagotu egiten zuen. Ac-ren kasuan, CO₂-ak desberdintasun esangarria sortzen zuen arren (p= 0.049), lehorteak ez zuen eraginik eta elkarrekintzarik ere ez zen ikusi.



5.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen NAD-GDH aktibitatea, ondo ureztatuak (K) eta lehorteko tratamentukoak (L), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza).

Nitrogenoaren metabolismoko produktuak proteinak direnez, prozesu honen egoera orokorra aztertzeko proteinen kontzentrazioak aztertu zen. Tp-ren kasuan CO₂ (p= 0.002) eta lehorteak (p< 0.001) desberdintasunak sortu zituzten proteinen kontzentrazioan, 700 ppm-tan hazitako landareek proteina gutxiago zuten kontzentrazio baxuagoan hazitakoak baino eta lehortekoek kontrolekoek baino (6.Irudia). Lehortean eta 400 ppm-tako landareen proteina kontzentrazioa baxuagoa zuten kontrolekoarena baino, baina faktoreen arteko elkarrekintza ez zen esangarria. Ac-ren kasuan, lehorteak proteina kontzentrazio murrizten zuen (p= 0.010), eta murrizpen hori 400 ppm-tan hazitako landareetan handiagoa zen 700 ppm-tan hazitakoena baino.



6.Irudia. *Trifolium pratense* (Tp) eta *Agrostis capillaris* (Ac) espezieen proteina edukia, lehorteko tratamenduan (L) eta ondo ureztatua (K), CO₂ kontzentrazio desberdinetan, 400 ppm (txuria) eta 700 ppm (beltza). PL, pisu lehorra.

EZATABAIDA

Nitratoaren erredukzioa sustraietan eta hostoetan burutu dezakete landareek. Hala ere, prozesu hau desberdina izango da espeziearen arabera (Taiz & Zeiger, 2011). Inguruneko kontzentrazio baxua denean, sustraietan asimilatuko da batez ere eta kontzentrazioa emendatu ahala, hostoetara gehiago traslokatuko da, bertan asimilatzen. Ikerketa honetan substratuko NO₃⁻ kontzentrazioa Hoagland bidez gainsaturatu zenez, bi espezieak iturri berdina zuten baina NR_{akt} balio altuagoak zituenez Ac-n, Tp-k baino gehiago asimilatzen du hostoetan.

Tp-n ez da CO₂ kontzentrazio desberdinen eraginezko NR_{akt} aktibitate desberdinik behatu eta hori, CO₂ aklimatazioari zor dakioko. Hasieran, CO₂ emendioarekin C asimilazioa asko emendatzen da, baina momentu batean biomasan metatu dezakeen baina karbonodun eskeleto gehiago sortzen dituztenez, energia aurrezteko, zenbait espeziek Errubisko entzimaren maila gutxitzen dutela ikusi da (Long *et al.*, 2004). Ondorioz, 400 ppm-tan zegoen C asimilazio tasa antzekoa mantentzen da, NR_{akt} aktibitatean desberdintasunik ikusi gabe. Bestalde, nahiz eta aklimatazioa jasan, aurretiaz sorturiko NR entzima kopuru handiagoak agertuko dira 700 ppm-tan hazitako landareetan. CO₂ altuetan hazitako landareek hasiera batean azukre kontzentrazio altua izango dute eta hauek NR geneen aktibazioa eragingo dute, entzima honen sintesia emendatuz (Stitt & Krapp, 1999). Nahiz eta aklimatazioaren ondorioz inhibituta egongo litzateke EDTA botatzean denak aktibatzen dira eta horrek eragiten du desberdintasun esangarriak agertzea CO₂ kontzentrazio desberdinen artean.

NH_4^+ -ren asimilazioan ordea, CO_2 kontzentrazioak eragindako desberdintasuna ikusten da. CO_2 kontzentrazio altuak NR_{max} igotzen duen arren, lehorreak karbonodun eskeletoen ekoizpena murriztuko duenez NO_3^- erredukzioa murriztu egingo da.

Tp-ren kasuan, CO_2 kontzentrazio altuek GS aktibitatea murrizten dute. Honen arrazoia, CO_2 emendioaren ondorioz fotoarnasketan ematen den murrizketa izan daiteke. Izan ere, kloroplastoetako GS-ak fotoarnasketan sortutako NH_4^+ asimilatzen espezializatu dira (Taiz & Zeiger, 2011) eta gure esperimenduak ez du NO_3^- erredukziotik asimilatzen denarekiko desberdintzen. Hala, inguruneko CO_2 -a emendatzean C:O erlazio emendatuko da eta Errubiskoak ez du hainbeste O_2 finkatuko, fotoarnasketa prozesua murriztuz (Edwards & Coruzzi, 1989; Cock *et al.*, 1991). Lehorreak GS aktibitatea murriztuko du baita ere, erreakzioa burutzeko beharrezkoa duen energiaren ekoizpena murriztuz edo NO_3^- erredukziotik datorren NH_4^+ baxua dagoelako. CO_2 kontzentrazioaren emendioak eta lehorreak GS aktibitatea murrizten duten arren, NADH-GDH aktibitatea emendatzen dute. Lehen esan bezala, GS-GOGAT bidea inhibitzen denean beste bide hau erabil dezakete landareak (Oaks, 1995), baina emaitzetan ikus daitekeen bezala ez da guztiz konpensatzen GS-GOGAT bidean izandako murrizketa, aktibitate baxuagoa izaten baitu. Hala eta guztiz ere, glutamato deshidrogenasaren (NAD-GDH) funtzio nagusia eskeleto karbonodunen eskasiak sortutako proteinen desaminazioa izaten da (Robinson *et al.*, 1992), Tp-ren kasuan CO_2 kontzentrazio altuak entzimaren aktibitatea murrizten du, ez delako karbonodun eskeletoen beharrik.

Tratamendu bakoitzean agertzen den pisu lehorreko proteinak aztertzean, CO_2 kontzentrazio altuetan eta lehorrean gertatzen den GS entzimaren aktibitate murrizpena, NADH-GDH entzimak konpensatzen duela, nahiz eta guztiz ez izan, proteina kontzentrazio antzeko baita bi CO_2 kontzentrazioetan. Hala eta guztiz ere, 400 ppm eta 700 ppm-tan eta kontroleko baldintzetan hazitako landareetan ikusten den proteina kontzentrazio desberdintasun hori, aklimatazioa baino lehen 700 ppm-tan metaturiko almidoi kontzentrazio altuaren ondorioa izan daiteke. Izan ere, almidoia pisu handia emango dio lagin horiei eta proteinak diluitu egingo dira pisu lehorreko.

Ac-ren kasuan, NO_3^- erredukzioan CO_2 kontzentrazioaren eragina ikusten da, hau da 16 egunetan ez da aklimataziorik emango. Kontzentrazio altuetan C gehiago asimilatuko da eta ondorioz NR_{akt} aktibitate emendatu egingo da. Hala eta guztiz ere, lehorreko tratamenduek kontrolekoek baino aktibitate baxuagoak izango dituzte. NR_{max} aktibitatea ere emendatuko da CO_2 kontzentrazioarekin, karbonodun eskeleto gehiago egongo baita, nahiz eta aktibazio egoera ez Tp-n bezain beste hobetu. Bi faktoreen elkarrekintza dela eta lehorreak mugatu egingo du CO_2 kontzentrazio altuak eragindako aktibitatearen emendioa.

NH_4^+ asimilazioan lehorreak izango du eragina batez ere, GS-ren aktibitatea murriztuz, nahiz eta lehorrearen eragina ez den hain handia CO_2 kontzentrazio altuetan. CO_2 kontzentrazioa aldatzean, C asimilazioa aldatu egiten da eta honen ondorioz fotoarnasketa ere bai. Tp-n esan

bezala, kloroplastoetako GS-ak fotoarnasketako NH_4^+ asimilatzen espezializatu dira (Taiz & Zeiger, 2011) eta fotoarnasketaren murrizpen batek entzima honen aktibitatean ere murrizpena ekarriko luke. Baina lehorreak gasen elkartrukea zailduko duenez, GS-ak berez eman beharko litzatekeen baino aktibitate baxuagoa azalduko du (Edwards & Coruzzi, 1989; Cock *et al.*, 1991). GS-aren murrizpena ez da nabaria izango, beraz, faktoreek ez dute NADH-GDH entziman inongo eraginik izango. NAD-GDH aktibitatean CO_2 -a da eragina duen faktore bakarra, lehen esan bezala, karbonatodun eskeletoen eskasiaren ondorioz emendatzen da (Robinson *et al.*, 1991), CO_2 altuetan murriztuz. Baina hala ere, entzima honetan ez da tratamenduen arteko alde nabaririk topatu. Proteina kontzentrazioetan ez da desberdintasun handirik ikusten tratamendu gehienetan, CO_2 kontzentrazio altuetan eta lehorrean izan ezik, zena NO_3^- erredukzioaren murrizketaren ondorioa izango da. Kasu honetan, NH_4^+ asimilazioa ez da proteinen kontzentrazioen desberdintasunak azaltzeko gai.

ONDORIOAK

Tp-n CO_2 -ak eragina dauka nitrogeno metabolismoan baina NH_4^+ asimilazioan batez ere, NO_3^- erredukzioan aklimatazioaren ondoriozko erregulazio ematen baita. Gero eta CO_2 altuagoetan, hasieran prozesu guztiak emendatuko dira baina aklimatazioa eman ahala, N metabolismoa emendatu beharrean murriztu egingo da, GS-aren murrizpenaren ondorioz. Hala ere, NADH-GDH entzimaren emendioak bukaerako proteinen kontzentrazio hainbeste ez jaisten lagunduko du. Lehorreak ere eragina izango du GS-aren aktibitatean CO_2 -ak sortutako murrizpenak areagotzen baititu.

Ac-ren kasuan, CO_2 kontzentrazioak nitrogenoaren metabolismoaren lehenengo zatian, NO_3^- erredukzioan, eragiten du batez ere, CO_2 kontzentrazio altuetan emendatuz eta lehorrea NH_4^+ asimilazioan, bertako entzimen aktibitatea murriztuz. Hala ere, azken honen eragina ez da N metabolismoan hainbeste nabarituko, beraz, Ac-n nitrogenoaren metabolismoan, NO_3^- erredukzioaren murrizpenak eragindakoa izango da batez ere.

Nitrogenoa elementu mugikorra denez, lehenago esan bezala, hostoez gain sustraietan ere erreduzitzen da NH_4^+ -ra, beraz, etorkizuneko ikerketa bati begira organo hauetan gertatzen denaren inguruko informazioa izatea interesgarria litzake. Bestalde, kontuan hartuta naturan bi espezie hauek ez liratezkeela inoiz isolatuta agertuko, hau da, lehia intraespezifikoz gain, interespezifikoa ere izango zuketela, ikerketan espezie arteko elkarrekintzak CO_2 kontzentrazioaren eta lehorrearen eragina nola aldatzen den ikustea ere interesgarria litzake, lorontzietan espezie bakarra erein beharrean nahastuta landatuz.

ESKERRONAK

Eskerrak eman nahi dizkiot Usue Perez doktoreari, bere esperientziak eta kritika zorrotzak lan honen garapen egokia burutzen lagundu didalako, Jon Mirandari laborategiko lanean emandako argibideengatik eta Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Landareen Biologia eta Ekologia Saileko Landare Fisiologiako laborategiari, beren azpiegiturak ikerketa honetarako uzteagatik.

BIBLIOGRAFIA

-Abd-El Baki G.K., Siefritz F., Man H.M., Weiner H., Kaldenhoff R. & Kaiser W.M., 2000. *Nitrate reductase in Zea mays L. under salinity*. Plant Cell Environ. 23, 515–521.

-Alonso A., Pérez P. & Martínez-Carrasco R., 2009. *Growth in elevated CO₂ enhances temperature response of photosynthesis in wheat*. Plant Physiology . 135, 109–120.

-Arnon D.I. & Hoagland D.R., 1940. *Crop production in artificial solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients*. Soil Science. 50, 462–485.

-Bazzaz F. A., 1990. *The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels*. Annual Review of Ecology and Systematics. 21, 167-196.

-Bowes G., 1993. *Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 44, 309-332.

-Bradford M.M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anals of Biochemmistry. 72, 248–254.

-Cock J.M., Brock I.W., Watson A.T., Swamp R., Morby A.P. & Cullimore J.V., 1991. *Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of Phaseolus vulgaris*. Plant Molecular Biology. 17, 761-71.

-Edwards J.W. & Coruzzi G.M., 1989. *Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase*. The Plant Cell. 1, 241-248.

- Foyer C.H., Valadier M.-H., Migge A. & Becker T.W., 1998. *Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves*. *Plant Physiology*. 117, 283–292.
- González-Moro B., Lacuesta M., Royuela M., Muñoz-Rueda A. & González-Murua C., 1993. *Comparative study of the inhibition of photosynthesis caused by aminooxyacetic acid and phosphinothricin in Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*. 142, 161–166.
- Heckathorn S.A., De Lucia E.H. & Zielinski R.E., 1997. *The contribution of drought relates decreases in foliar nitrogen concentration to decrease in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses*. *Physiology. Plant Cell Reports*. 19, 1127-1134.
- Hymus G.J., Baker N.R. & Long S.P., 2001. *Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. Dactylis glomerata grown in two levels of nitrogen nutrition*. *Plant Physiology*. 127, 1204–1211.
- Ireland R.J. & Lea P.J., 1999. *The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. in Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. ed Singh BK (Marcel Dekker, New York), 49–109.
- Jablonski L., Wang X. & Curtis P., 2002. *Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a metaanalysis of reports on 79 crop and wild species*. *New Phytologist*. 156, 9-26.
- Lacuesta M., González-Moro B., González-Murua C. & Muñoz-Rueda, A., 1990. *Temporal study of the effect of phosphinothricin on the activity of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and nitrate reductase in Medicago sativa L*. *Journal of Plant Physiology*. 136, 410–414.
- Lawlor D. & Cornic G., 2002. *Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants*. *Plant, Cell and Environment*. 25, 275-294.
- Long S. P., Ainsworth E. A., Rogers A. & Ort D. R., 2004. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 591–628.
- Oaks A., 1995. *Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply*. *Canadian Journal of Botany*. 73, 1116–1117.

- Poorter H. & Navas M., 2003. *Plant growth and competition at elevated CO₂: winners, losers and functional groups*. *New Phytologist*. 157, 175-198.
- Prentice I.C., Farquhar G.D., Fasham M.J.R. *et al.*, 2001. The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Houghton JT Ding Y, Griggs DJ *et al.*), Cambridge University Press, Cambridge. 183-237.
- Robinson S.A., Slade A.P., Fox G.G., Phillips R., Ratcliffe R.G. & Stewart G.R., 1991. *The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism*. *Plant Physiology*. 95, 509-516.
- Robinson S.A., Stewart G.R., & Phillips R., 1992. *Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures*. *Plant Physiology*. 98, 1190–1195.
- Robredo A., Pérez-López U., Miranda-Apodaca J., Lacuesta M., Mena-Petite A. & Muñoz-Rueda A., 2011. *Elevated CO₂ reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery*. *Environmental and Experimental Botany*. 71, 399–408.
- Stitt M. & Krapp A., 1999. *The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients*. *Plant, Cell and Environment*. 22, 583-622.
- Taiz L. & Zeiger E., 2011. *Plant Physiology*. Sinauer, Fifth Edition.
- Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D. & Lawlor D. W., 1999. *Water stress inhibits plants photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP*. *Nature*. 401, 914-917.
- Turano F.J., Dashner R., Upadhyaya A. & Caldwell C.R., 1996. *Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings*. *Plant Physiology*. 112, 1357–1364.
- Urabe J., Naeem S., Raubenheimer D. & Elser J.J., 2010. *The evolution of biological stoichiometry under global change*. *Oikos*. 119, 737-740
- Ward J. & Strain B., 1999. *Elevated CO₂ studies: past, present and future*. *Tree Physiology*. 19, 211-220.

