

MODELO DINAMICO DEL METABOLISMO DEL NITROGENO EN PLANTAS SUPERIORES. II. VALIDACION DEL MODELO¹

Rafael Novoa²
Dr. R. S. Loomis³

INTRODUCCION

El modelo presentado en la Parte I de este trabajo representa hipótesis iniciales acerca de la integración de sistemas bioquímicos en hojas y raíces. El paso siguiente, probar la validez de esas hipótesis, es un problema difícil y complejo. Hay tres caminos básicos para ello: a) Pruebas de validación, en las que las predicciones que hace el modelo (valores de las variables de estado, por ejemplo) se comparan con resultados experimentales obtenidos de un sistema real. Los datos experimentales deben ser independientes de los usados en la obtención de parámetros para el modelo; b) El análisis de sensibilidad, que consiste en una variación sistemática de los datos (parámetros, constantes, relaciones fundamentales) y en la estructura del modelo (presencia o ausencia de un componente del modelo) Van Keulen (1975). Este análisis identifica

las partes del modelo, procesos, parámetros o constantes que son importantes o a las cuales el modelo es "sensible". Constituye una herramienta poderosa para evaluar los supuestos que subtienden la estructura del modelo; c) El análisis de comportamiento, que implica probar el realismo con el que el modelo responde a perturbaciones, tales como transiciones día-noche, cambios en los suministros de substratos o remoción de partes del sistema (poda). Una validación completa requiere el uso de estos tres caminos. El modelo presentado fue construido para lograr una mayor comprensión científica del sistema y no como base para un manejo del sistema; por ello estamos más interesados en el realismo de la simulación que en su precisión.

A continuación se muestran ejemplos de validación, análisis de sensibilidad y de comportamiento del modelo.

PRUEBA DE VALIDACION

En la Figura 1 se compara la simulación que hace el modelo sobre la absorción de nitratos, en función de la concentración de nitratos, con resultados experimentales para *Avena fatua* y *Bromus mollis* (Lancaster, 1977). Los resultados del modelo coinciden bastante bien con los resultados experimentales, tanto en las magnitudes como en la naturaleza de la respuesta.

¹Recepción de originales: 22 de septiembre de 1980.

Parte de tesis de doctorado del primer autor.

²Ing. Agr., Ph.D., Programa Ecología y Manejo, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Department of Agronomy and Range Science, University of California, Davis, USA.

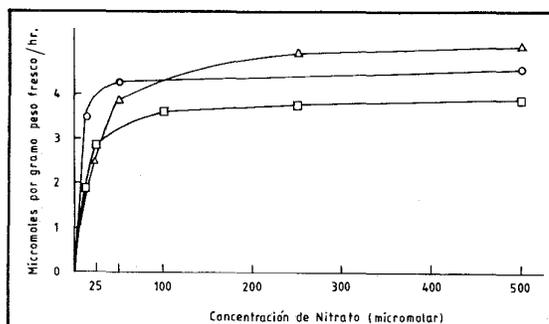


FIGURA 1. Tasas experimentales y simuladas de absorción de nitrato. Los valores simulados son las tasas instantáneas observadas después de 72 horas de procesado el modelo a las concentraciones indicadas. Tasas simuladas (\square); Avena fatua (Δ); Bromus mollis (\circ). Los valores experimentales son de Lancaster (1977).

ANALISIS DE SENSIBILIDAD

En el Cuadro 1 se muestra un ejemplo de los resultados de un análisis de sensibilidad.

Cambios sustanciales en el valor de K_m de la nitrato reductasa tienen efectos pequeños en las tasas de reducción pues hay una retroalimentación inmediata

que aumenta o disminuye la concentración del nitrato en el citosol. El efecto final en la tasa es sólo entre 7 y 100/o cuando se dobla el K_m . Por la razón anterior el efecto sobre la concentración de amonio es bajo, y por lo tanto, la síntesis de aminoácidos se ve muy poco influida (la síntesis de glutamina varía sólo un 100/o por cada duplicación del K_m de la nitrato reductasa). El sistema no parece ser muy sensible a cambios en el K_m de la nitrato reductasa para nitrato. Es, sin embargo, posible que tales cambios sean más importantes para el crecimiento de la planta en períodos más largos de tiempo, pues podría generarse un leve déficit de amonio.

ANALISIS DE COMPORTAMIENTO

Transiciones día-noche

En la Figura 2 se muestran las variaciones en las tasas de reducción del nitrato, de la glutamina y en los niveles de nitratos en el citosol en un período de 24 horas. La simulación muestra el gran aumento en las tasas de reducción y síntesis que se producen en la transición noche-día o día-noche. Este efecto se debe a que uno de los supuestos del modelo es que la luz aumenta la permeabilidad de la membrana de la vacuola; esto aumenta el flujo de nitratos hacia el citosol, aumenta el contenido de este ión en dicho com-

CUADRO 1. EFECTO DE CAMBIOS EN EL K_m DE LA NITRATO REDUCTASA, PARA NITRATO, EN LAS TASAS DE REDUCCION Y EN LAS CONCENTRACIONES DE IONES DE NITRATO Y DE IONES DE AMONIO, TANTO EN HOJAS COMO EN RAICES. LOS VALORES SIMULADOS FUERON OBTENIDOS PROCESANDO EL MODELO DURANTE 8 HORAS CON UNA CONCENTRACION EXTERNA DE 500 μM DE NITRATOS. EL K_m ELEGIDO EN EL MODELO ES DE 400 μM .

	K _m . (Micromolar)		
	200	400	800
HOJAS			
Tasa reducción nitratos (micromoles g ⁻¹ (peso fresco) h ⁻¹)	0,557	0,520	0,467
Concentración nitratos en citosol (Micromoles g ⁻¹ (peso fresco))	0,088	0,118	0,190
Concentración iones amonio en citosol	0,15	0,15	0,14
RAICES			
Tasa reducción nitrato	1,06	1,01	0,94
Concentración nitratos en citosol	2,53	2,57	2,65
Concentración ión amonio en citosol	0,018	0,017	0,012

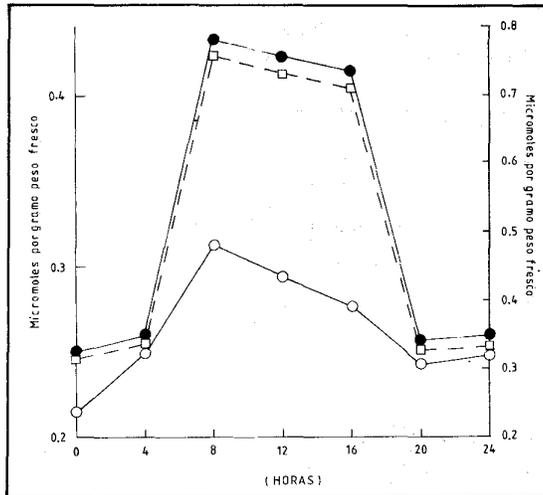


FIGURA 2. Niveles de nitrato, tasas de reducción del nitrato y tasas de síntesis de glutamina en hojas, simulados durante un período de 24 horas, en un medio que tiene una concentración de $500 \mu\text{M}$ de nitrato. Niveles de nitrato en el citosol (○), tasa de reducción de nitrato (●) y tasa de síntesis de glutamina (□).

partimento con la consiguiente elevación de la tasa de reducción e intensificación de la síntesis de glutamina. El tipo de comportamiento del modelo en estas transiciones es similar a los resultados experimentales obtenidos por Hageman y Flescher (1960) o por Nicholas, Harper y Hageman (1976).

El supuesto usado en el modelo fue que la luz aumentaba la permeabilidad de las membranas cuatro veces. Se probó qué sucedía si se usaba un factor de dos o de 0,5 (0,5 significa que el transporte se reduce con la luz). Con el factor 2 los niveles de nitrato y amonio no cambiaron durante los períodos oscuros, pero a la luz ellos disminuyeron a la mitad, en el citosol. También se redujo a la mitad el nivel de amonio en el cloroplasto; este cambio se debió a la reducción de la concentración de nitratos en el citosol lo que disminuyó la reducción de los nitratos. Todo ello provocó una disminución en la síntesis de aminoácidos y en las exportaciones de éstos, a niveles inferiores a los requeridos por el crecimiento de la planta. El efecto de reducir la permeabilidad por la luz (factor 0,5) produjo una depresión mayor en la reducción de nitratos y un gran déficit de amonio. Parecería que la hipótesis inicial de que la luz aumenta la permeabilidad de las membranas da la mejor concordancia con la realidad. Sin embargo, también se podría lograr esta misma concordancia con otras hipótesis que afectan al transporte de nitratos de las raíces por efecto de la luz. En todo caso este ejemplo ilustra el uso del modelo para prueba de hipótesis.

Se vio, también, que la transición día-noche era dominada por el efecto de la luz cuando las temperaturas eran bajas en la noche, pero si eran altas los efectos de la temperatura eran dominantes sobre la luz.

Efecto del área foliar

Ya que en el modelo las hojas son la principal fuente de carbohidratos y de glutamato, pareció de interés ver el efecto que tendría el "podar" las hojas a la mitad de su valor inicial. Los cambios producidos en las concentraciones y en las tasas de crecimiento se muestran en el Cuadro 2.

Se puede observar una gran influencia de la poda de hojas en las concentraciones de todas las variables de estado. Todas las concentraciones aumentan al doble o más, excepto el amonio que disminuye a la mitad.

Por otra parte, las tasas de reducción de nitratos y de síntesis de aminoácidos, prácticamente se duplican, de tal manera que la producción total de aminoácidos se mantiene aproximadamente constante y por ello no se observa efecto en las tasas de crecimiento. Eso sí, la tasa de fotosíntesis neta disminuyó en 30% lo que hizo que la glucosa disponible disminuyera notablemente. El déficit de glucosa eventualmente causará una reducción en las tasas de crecimiento al agotarse las reservas.

Una de las mediciones difíciles de hacer experimentalmente es la de las concentraciones de sustrato presente en el citosol o cloroplasto de las células vegetales. Segel (1975), basándose en consideraciones teóricas, sugirió que estas concentraciones deben ser cercanas a los de los Km. de las enzimas correspondientes porque, a ese nivel, la enzima es más sensible a cambios en las concentraciones y su potencial catalítico tiene más poder regulador. La simulación muestra que los niveles de nitrato en el citosol de las hojas fueron cercanos al valor del Km. (400 micromolar), pero en el citosol de las raíces fue varias veces mayor (2.500 micromolar). Esto último puede indicar que los niveles de nitrato reductasa pueden llegar a ser limitantes para la reducción de nitratos, condición que sugiere una base racional del por qué la nitrato reductasa evolucionó como un sistema inducible capaz de rápidas respuestas a cambios en las concentraciones de nitratos. Tales especulaciones representan un atractivo beneficio del esfuerzo modelador y parecería haber considerable potencial, en el modelo, en esa dirección. Sin embargo, es importante recordar que estas conclusiones están muy ligadas a la elección de los parámetros y por ello son más bien un producto del enfoque del sistema tomado al construir el modelo, que el resultado de la simulación.

**CUADRO 2. EFECTO DE REDUCIR A LA MITAD EL AREA FOLIAR
EN LAS CONCENTRACIONES, TASAS Y EL CRECIMIENTO SIMULADO
POR EL MODELO DESPUES DE 36 HORAS**

Peso seco hojas (g)	46	23
TASAS	(Micromoles x g ⁻¹ (peso fresco) x hr ⁻¹)	
Reducción nitratos en citosol	0,601	1,16
Síntesis glutamina en cloroplasto	0,553	1,15
Síntesis glutamato en cloroplasto	1,09	2,2
Exportación glutamato desde hojas	0,301	0,578
CONCENTRACIONES	(Micromoles x g ⁻¹ (peso fresco))	
Nitrato en citosol hojas	0,171	0,642
Amonio en cloroplasto (x10 ⁻³)	0,752	0,370
Glutamina en cloroplasto (x10 ⁻²)	0,477	1,6
Glutamato en cloroplasto	0,057	0,111
Glucosa en la planta (milimoles/planta)	42,5	29,0
TASAS DE CRECIMIENTO RELATIVO	(hr ⁻¹)	
Hojas	0,0206	0,0207
Raíces	0,0207	0,0207

DISCUSION;

La validación de este modelo está lejos de ser completa como para hacer comparaciones entre los resultados simulados y los resultados experimentales. La validación (muy limitada) muestra que cuando el suministro de nitrato es bajo, el comportamiento del modelo es dominado por las transiciones día-noche a través de un posible efecto de la luz en las membranas del tonoplasto. Este supuesto puede ser incorrecto, aún cuando explica resultados experimentales publicados. Así, por ejemplo, es posible que el efecto de la luz esté ligado a efectos sobre el poder reductor o suministro de energía o a influencias de la luz sobre la transpiración. El supuesto del efecto de la temperatura sobre la actividad de la nitrato reductasa en la oscuridad parece ser importante. Se supuso que la temperatura afectaba la actividad de la nitrato reductasa en la noche, reduciendo la cantidad de enzima presen-

te a través de un efecto en la velocidad máxima. Esto también puede deberse a una menor disponibilidad de azúcar por efecto de la temperatura en el crecimiento y respiración oscura. Estos aspectos requieren experimentos adicionales.

Una validación más acuciosa del modelo debe incluir una evaluación más detallada de la influencia de los circuitos de retroalimentación, tanto para mejorar la capacidad explicativa del modelo como para simplificar el programa de cálculos. Muchos de los aspectos incluidos en el modelo, tales como el efecto del pH en la absorción de nitratos, no han sido validados.

Mejoras potenciales incluyen una mejor descripción del nitrato en el espacio libre, la absorción del nitrato y amonio por las hojas, la "carga" del floema con aminoácidos y la recirculación de éstos, la síntesis de proteínas y su degradación, mejor descripción de la morfología, etc.

RESUMEN

Este trabajo informa sobre la validación parcial de un modelo de simulación del metabolismo del nitrógeno en plantas superiores. Se dan ejemplos de comparación entre datos experimentales y predicciones que hace el modelo, de análisis de sensibilidad y de análisis de comportamiento. El modelo simula bien las

tasas de absorción de nitrato y las transiciones día y noche en la asimilación del nitrógeno y muestra un comportamiento que es realista en muchos aspectos. Se incluye una discusión sobre las limitaciones del modelo actual y se sugieren áreas que sería importante mejorar.

SUMMARY

A DYNAMIC MODEL OF NITROGEN METABOLISM IN HIGHER PLANTS. II. VALIDATION OF THE MODEL

This paper illustrates selected aspects of the validation of a nitrogen metabolism model in higher plants. Outputs of the model are compared with experimental data, and examples of sensitivity and behavior analysis are shown. The model provides good simulations

for nitrate uptake, and light-dark daily transitions, and shows a realistic behavior in many aspects. Limitations of the present model and possible areas of improvement are discussed.

LITERATURA CITADA

- HAGEMAN, R. H. and FLESHER, D. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* 35: 700-706.
- LANCASTER, D. L. 1977. Ecological significance of nitrate uptake and reduction by annual grass species. Ph.D. Diss. University of California, Davis.
- NICHOLAS, J. C.; HARPER, J. E. and HAGEMAN, R. H. 1976. Nitrate reductase activity in soybean (*Glycine max* (L) Mev.). I. Effect of light and temperature. *Plant Physiol* 58: 731-735.
- SEGEL, I. 1975. *Enzyme kinetics*. John Wiley, New York, 957 pp.
- VAN KEULEN, H. 1975. Simulation of water use and herbage growth in arid regions. Wageningen: PUDOC. 176 pp.