



CONSIDERACIONES SOBRE METABOLISMO DE NITROGENO EN PLANTAS

El nitrógeno molecular (N_2) constituye el 80 % de la atmósfera y es, junto con el agua, uno de los principales factores que limitan el crecimiento de las plantas. El nitrógeno es necesario, para todos los seres vivos, porque forma parte de los aminoácidos, proteínas, coenzimas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otras moléculas.

Las **fuentes de nitrógeno** utilizadas por las plantas son formas de **nitrógeno combinado** (NO_3^- y NH_4^+) presentes en cantidades variables en el suelo. Las raíces de las plantas absorben NO_3^- y NH_4^+ (figura 1). Algunas plantas como las leguminosas, pueden también usar como fuente de nitrógeno el NH_4^+ producido a nivel de sus nódulos por bacterias capaces de reducir el N_2 atmosférico, proceso llamado **fijación biológica de nitrógeno (FBN)** (figura 1 y 3A).

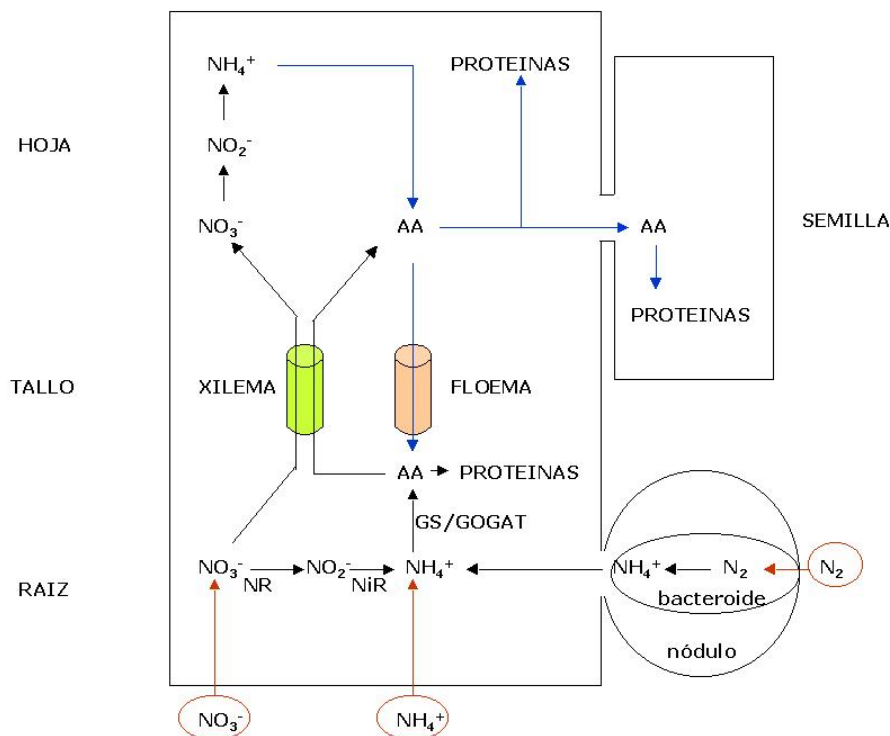


Figura 1. El NO_3^- y el NH_4^+ son las formas de nitrógeno combinado absorbidas por las plantas. A su vez, en las leguminosas, el N_2 atmosférico puede ser reducido a NH_4^+ por los bacteroides que se encuentran en los nódulos de la raíz. El NH_4^+ asimilado en la raíz es trasladado a diferentes órganos de la planta por el floema. El NO_3^- puede ser reducido en la raíz o transportado a la hoja por el xilema para ser asimilado. Los aminoácidos producidos en la hoja pueden ir por el floema al tallo, a la semilla o a la raíz.

La incorporación de nitrógeno a los compuestos carbonados se llama **asimilación** y para que este proceso ocurra, el nitrógeno tiene que estar bajo la forma de NH_4^+ , por lo que si fue absorbido como NO_3^- , tiene que ser reducido previamente.

1. La principal fuente de nitrógeno del suelo es el nitrato

1.1 Absorción

Las plantas absorben NO_3^- desde el suelo y son capaces de mantener concentraciones mucho mayores de este ion dentro de sus células o en la savia xilemática con respecto al suelo. El NO_3^- atraviesa la membrana plasmática mediante proteínas transportadoras específicas.

En la mayoría de las plantas existen dos tipos de permeasas; una constitutiva, con una K_M alta para el NO_3^- , y otra inducible, con una K_M más baja. Una evidencia importante acerca de la existencia de un sistema inducible por el NO_3^- , es que la absorción desciende en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. Otra evidencia es que en plantas crecidas sin NO_3^- en el medio de cultivo, se encuentra NO_3^- en las células de la planta luego de unas horas de la adición de éste al medio.

Este tipo de transporte dependiente de ATP decrece con bajas $p\text{O}_2$ en el entorno radicular, o en presencia de inhibidores o desacopladores de cadena respiratoria.

1.2 Reducción de nitrato

El NO_3^- puede ser reducido en las células de las raíces, o bien ser transportado por el xilema al tallo o las hojas para ser reducido en alguno de esos órganos. La importancia relativa de los distintos órganos en la reducción del NO_3^- , varía con la especie. Mientras que en las plantas tropicales la reducción ocurre preferentemente en el tallo y en las hojas, en las de clima templado, especialmente las leguminosas, son las raíces las que reducen la mayor parte del NO_3^- . A nivel celular en cualquiera de estas plantas, el NO_3^- es reservado en la vacuola, para lo cual debe ser transportado a través de la membrana vacuolar o tonoplasto.

La reducción de NO_3^- a NH_4^+ es un proceso que ocurre en dos reacciones consecutivas; una catalizada por la enzima **nitrato reductasa** (NR) que reduce el nitrato a nitrito y otra catalizada por la **nitrito reductasa** (NiR) que reduce el nitrito y produce amonio (figura 2).

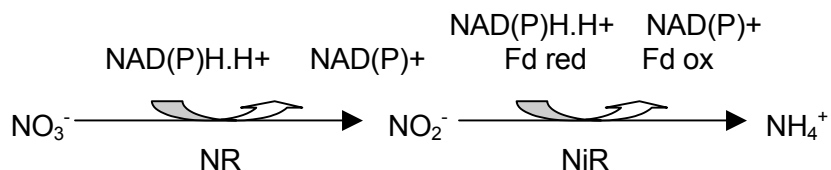


Figura 2. Reducción de NO_3^- a NH_4^+ catalizada por la nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR)

La NR es una enzima citosólica que usa NADH.H^+ o NADPH como donador de electrones, mientras que la NiR cloroplástica, emplea ferredoxina reducida (Fd red).

Cuando a una planta se le suministra NO_3^- , aumenta en forma notable tanto la proteína NR como su actividad en hojas y raíces. El aumento de la cantidad de NR se debe a la síntesis *de novo* de la proteína, y constituye el ejemplo más conocido de inducción de una enzima por su sustrato en plantas superiores.

La NiR, al igual que otras enzimas cloroplásticas, está codificada por un gen nuclear y es sintetizada en el citoplasma como una proteína precursora, con una secuencia N-terminal o péptido de tránsito que hace posible el ingreso al cloroplasto.

2. Algunas plantas se benefician de bacterias que reducen el nitrógeno atmosférico.

La capacidad de fijar nitrógeno está restringida a un número relativamente escaso de procariotas capaces de reducir enzimáticamente el N_2 a NH_4^+ . Este proceso, conocido como **fijación biológica de nitrógeno (FBN)** o diazotrofia, permite la obtención NH_4^+ , forma de nitrógeno asimilable por las plantas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden realizar este proceso en simbiosis, como es el caso de los rizobios que nodulan raíces de leguminosas (figura 3 A). Otros fijadores de nitrógeno, como las cianobacterias (figura 3 B) y *Azotobacter* que realizan la reducción de N_2 a NH_4^+ fuera de la planta, son ejemplos de **fijadores libres** de importancia agronómica.



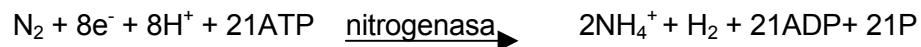
A



B

Figura 3. Nódulos inducidos por rizobios en raíces de una leguminosa (A). Cianobacteria fijadora de nitrógeno en vida libre, el ejemplar mostrado es del género *Anabaena* y fue aislada de arrozales de Treinta y Tres (B).

La ecuación que aparece abajo representa la obtención de NH_4^+ por FBN en una reacción catalizada por el complejo enzimático denominado **nitrogenasa**.

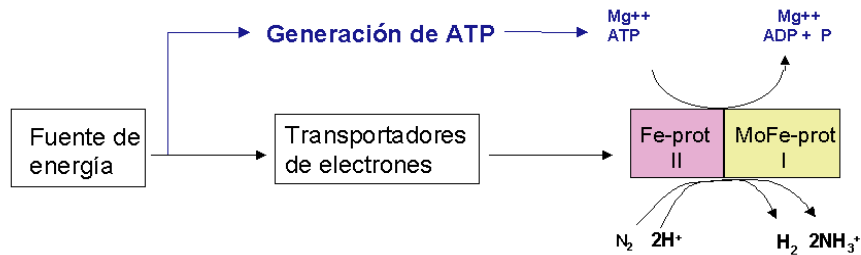


En la reacción anterior se gasta gran cantidad de ATP y se forma H_2 . Cuando este proceso se produce en los nódulos de las leguminosas, las bacterias obtienen energía del metabolismo de compuestos carbonados suministrados por la planta, derivados de la fotosíntesis, tales como oxalacetato y succinato. Es decir, a nivel de las bacterias que se encuentran en las células vegetales ocurren las vías metabólicas que permiten obtener ATP y poder reductor a partir de moléculas carbonadas que proporciona la planta.

La incorporación de N_2 a la biósfera por FBN se estima a nivel global es de unas 10^8 ton/año.

La composición y propiedades de la nitrogenasa son similares en todas las especies de las que se ha aislado. Dos metaloproteínas conforman el complejo enzimático: el componente I (proteína Fe-Mo) o nitrogenasa, donde se encuentra el sitio de unión del N_2 hasta su reducción a NH_4^+ y el componente II (proteína-Fe) o nitrogenasa reductasa, que aporta los electrones al componente I según se observa en el esquema que aparece abajo.

La transferencia de electrones desde la nitrogenasa reductasa a la nitrogenasa está acoplada a la hidrólisis de ATP por la nitrogenasa reductasa.



El complejo nitrogenasa es sensible al O_2 y cantidades muy bajas son suficientes para inactivar a la enzima. En los nódulos (figura 3 A), la proteína leghemoglobina es responsable de la protección de la nitrogenasa frente al O_2 .

Dado que el proceso de reducción de nitrógeno demanda altos niveles de energía, la actividad del complejo nitrogenasa se inhibe cuando hay baja relación ATP/ADP. En relación al costo energético, es interesante observar que la nitrogenasa se inhibe cuando hay en el medio nitrógeno combinado (NO_3^- o NH_4^+). Este hecho parece "lógico" en la medida que la utilización de estas formas de nitrógeno requiere menos energía que el proceso de FBN.

3. El amonio es el compuesto clave para que el nitrógeno sea asimilado por la planta

Tanto la reducción del NO_3^- como la fijación biológica de nitrógeno producen NH_4^+ que se incorpora a moléculas orgánicas por un proceso conocido como **asimilación** (figura 4). En los tejidos vegetales prácticamente todo el nitrógeno es asimilado por la vía GS/GOGAT. Esta es una vía cíclica que comprende dos reacciones catalizadas por las enzimas **glutamina sintetasa** (GS) y **glutamato sintasa** o glutamino oxoglutarato amino transferasa (GOGAT), figura 4.

La GS cataliza la incorporación del NH_4^+ al ácido glutámico (glu) para dar glutamina (gln) en un proceso que requiere ATP y Mg^{+2} . El nitrógeno del grupo amida de la glutamina es incorporado al α -ceto glutarato para dar dos moléculas de ácido glutámico en una reacción catalizada por la GOGAT. Una de las moléculas de glu sirve como aceptor del NH_4^+ nuevamente cerrando el ciclo y la otra molécula de glu es utilizada para obtener otros aminoácidos así como diferentes compuestos nitrogenados.

El bajo K_M de la GS para el NH_4^+ garantiza su inmediata asimilación lo que evita que este potente tóxico quede libre en la célula. El equilibrio de esta reacción se desplaza hacia la formación de producto, debido a la hidrólisis de ATP.

La GOGAT cataliza una aminación reductiva en la que se utiliza como cofactor al $NADH.H^+$ o ferredoxina reducida, según el órgano de la planta. Tanto la GS como la GOGAT se encuentran bajo distintas isoformas en todos los tejidos de la planta para asimilar rápidamente el NH_4^+ .

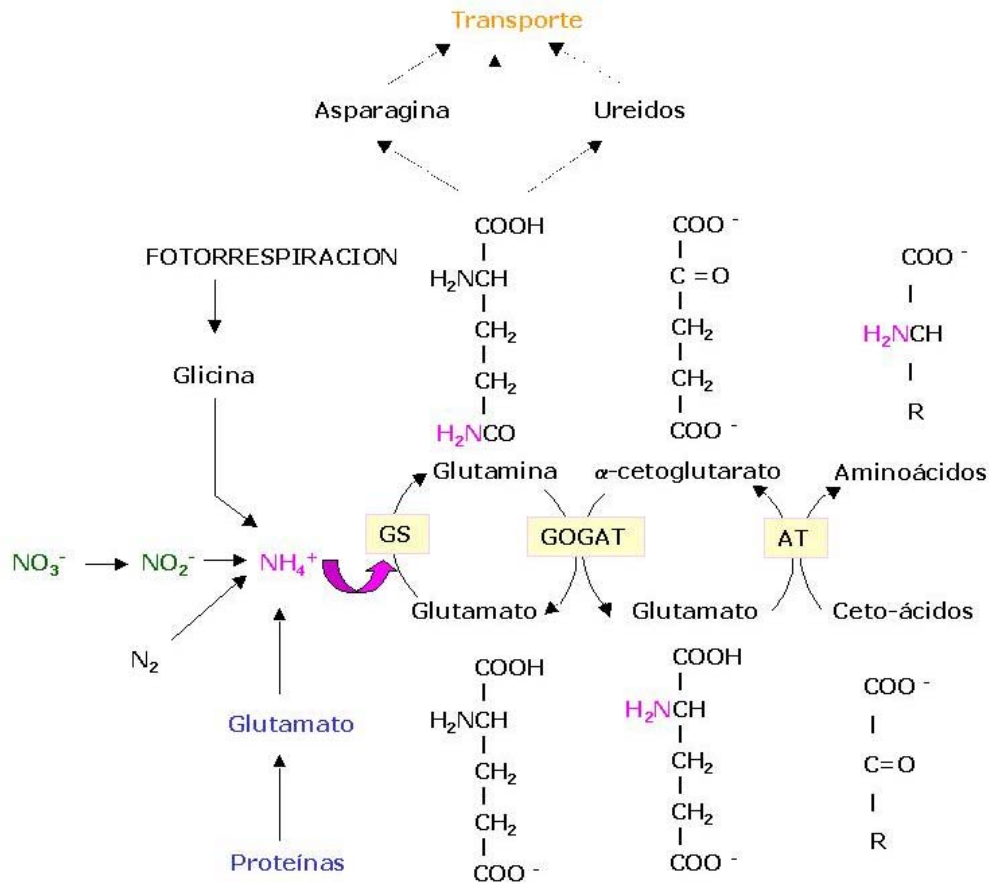


Figura 4. Esquema de la asimilación de NH_4^+ en plantas por el ciclo GS/GOGAT, de sus diferentes orígenes y de algunas moléculas organonitrogenadas que participan en su transporte.

Las **fuentes primarias** de NH_4^+ son, el NO_3^- , el propio NH_4^+ si es absorbido como tal y en algunas plantas el N_2 , que es previamente reducido a NH_4^+ por algún procarionta. Además de asimilar el NH_4^+ proveniente de estas fuentes primarias, es necesario que las plantas asimilen el NH_4^+ que se libera como consecuencia de la fotorrespiración en hojas de plantas C3 (figura 5). En estos órganos en condiciones normales de luz el NH_4^+ proveniente de esta vía supera al proveniente de las fuentes primarias.

Otras fuentes de NH_4^+ en tejidos vegetales son la asparagina, arginina y ureidos, compuestos usados por las plantas para transportar nitrógeno entre órganos, como raíz-hoja u hoja-fruto, etc. Otro proceso que produce NH_4^+ es la degradación de proteínas que se produce durante la germinación de las semillas, o a consecuencia de la senescencia de las hojas (figura 5).

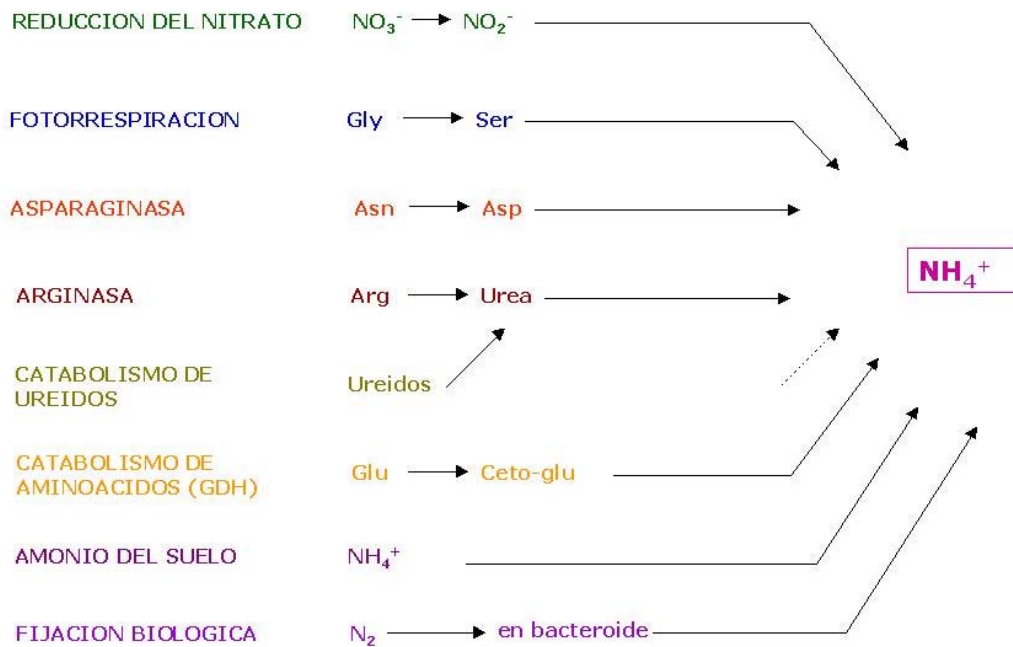


Figura 5. Fuentes de NH_4^+ para una planta. Las fuentes primarias de NH_4^+ son, el propio NH_4^+ si es absorbido como tal o el NO_3^- . Según se observa en la figura el NH_4^+ proviene de distintos procesos que ocurren en diferentes órganos de la planta. De esta forma las enzimas GS y GOGAT que participan en su asimilación están presentes en distintas formas enzimáticas. En las leguminosas el N_2 es reducido a NH_4^+ en los bacteroides.

En el proceso de senescencia, las proteínas son degradadas y los aminoácidos resultantes se transaminan para dar glutamato, que a su vez se desamina por acción de la **glutamato deshidrogenasa** (GDH) según la reacción



El NH_4^+ resultante en esos tejidos es asimilado por la GS e incorporado a compuestos que transportan nitrógeno, como la asparagina, arginina o ureidos, que son aprovechados en otras partes de la planta.

En situaciones de falta de carbono la GDH por desaminación reductiva del glutamato provee de α -cetoglutarato al Ciclo del ácido cítrico.

4. ¿Cómo se obtienen aminoácidos a partir de otros aminoácidos?

Las **reacciones de transaminación** son centrales en el metabolismo aminoacídico porque a través de ellas se sintetizan aminoácidos y también se degradan. Observe que mediante reacciones de transaminación, se transfiere el nitrógeno asimilado desde el glutamato a esqueletos carbonados para formar otros aminoácidos. Así, la síntesis de un aminoácido implica por lo general la degradación de otro aminoácido que funciona como donador del grupo amino (figura 6).

Las transaminasas o aminotransferasas, son enzimas que catalizan la transferencia del grupo amino del carbono α de un aminoácido, al carbono α de un cetoácido, para dar un nuevo aminoácido y un nuevo cetoácido (figura 6).

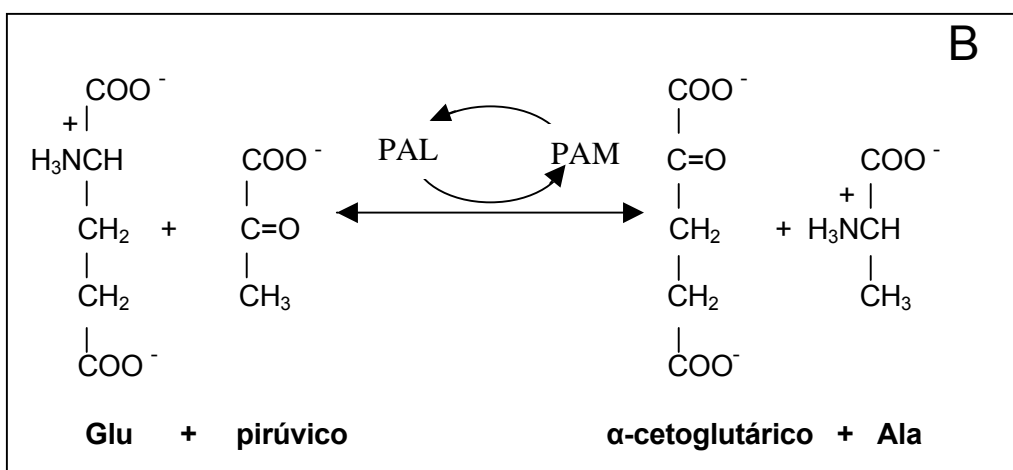
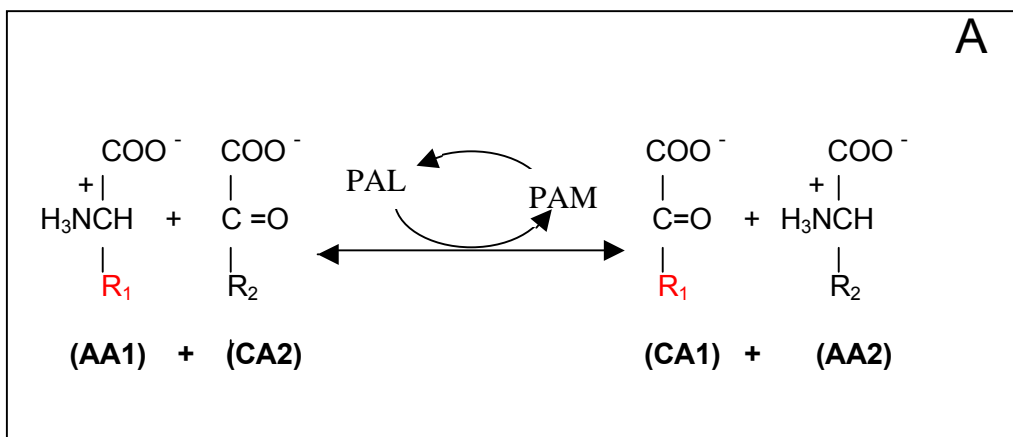


Figura 6. En A reacción general de transaminación que muestra como un aminoácido (AA1) se transforma en un cetoácido (CA1) y como el cetoácido (CA2) se transforma en un aminoácido (AA2). En este proceso se requiere de un cofactor el PAL/PAM que funciona como aceptor o donador del grupo amino. En B se representa un ejemplo concreto de transaminación glutámico - pirúvico.

El glutamato es el principal dador de grupos amino, dando origen a distintos aminoácidos y α -cetoglutarato, que puede funcionar nuevamente como aceptor del grupo amino de la glutamina en la reacción catalizada por GOGAT (figura 4).

Las transaminasas poseen un grupo prostético unido a su sitio activo; el **fosfato de piridoxal (PAL)** que proviene de la vitamina B6. En una reacción de transaminación (figura 6A) el aminoácido (AA1) cede su grupo amino al PAL que se transforma en **fosfato de piridoxamina (PAM)**. Como consecuencia, se produce un cetoácido (CA1) que se libera y el PAM cede el grupo amino al cetoácido sustrato (CA2), que se transforma así en el correspondiente aminoácido (AA2) y se regenera el PAL.

En vegetales se han encontrado y aislado transaminasas para todos los aminoácidos proteicos excepto para prolina, que es un iminoácido. La reversibilidad de las reacciones de transaminación permite cambios de acuerdo a la demanda de aminoácidos específicos, aunque algunas transaminasas tienden a actuar principalmente en una dirección.

5. Sólo algunos compuestos transportan nitrógeno entre órganos

El nitrógeno es movilizado dentro de la planta formando parte de moléculas tales como asparagina, glutamina, ureidos, arginina, entre otros. Estos compuestos se caracterizan por tener una alta relación N/C, que contribuye a la eficiencia del transporte. El compuesto nitrogenado transportado varía con la especie vegetal, de todas formas, la asparagina es el más comunmente usado por las plantas.

La mayoría de las leguminosas transportan el nitrógeno en forma de asparagina por el xilema independientemente de la forma de nitrógeno disponible por las raíces. Otras leguminosas transportan ureidos que tienen una relación N/C mayor.

En árboles también la asparagina es el transportador de nitrógeno de corta distancia, para traslocar nitrógeno a distancias mayores utilizan arginina, que también es usada por algunos árboles perennes como molécula de reserva de nitrógeno. Cuando se necesita el nitrógeno, la arginina es degradada por la arginasa, en una reacción del Ciclo de la urea, produciendo ornitina y urea. La ureasa convierte la urea en NH_4^+ y CO_2 y el NH_4^+ producido se asimila por la GS que forma glutamina, uno de los compuestos que transportan nitrógeno en las plantas.

El transporte de nitrógeno en la planta puede darse desde diferentes órganos, algunos ejemplos se resumen a continuación:

- desde los nódulos de leguminosas a hojas y frutos,
- desde las hojas senescentes a las hojas verdes y a frutos,
- desde las hojas verdes a tallos y frutos,
- desde los cotiledones en germinación a la plántula.

6. Todo el nitrógeno orgánico fue alguna vez parte del nitrógeno de la atmósfera

Las plantas convierten el nitrógeno de formas inorgánicas a orgánicas. Si esta conversión continuara indefinidamente, el suelo y la atmósfera se empobrecerían rápidamente de formas inorgánicas de nitrógeno.

En la naturaleza existen una serie de procesos interrelacionados, que conforman el **ciclo de nitrógeno**, que incluye la interconversión que se produce en la biosfera entre formas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno, como se muestra en la figura 7.

El análisis del ciclo se puede empezar por la entrada de nitrógeno atmosférico al ecosistema. Este proceso reductivo, conocido como **fijación biológica del nitrógeno**, es realizado por microorganismos fijadores de nitrógeno como rizobios, cianobacterias y azotobacter entre otros, que producen NH_4^+ . El NH_4^+ puede ser usado para sintetizar diferentes moléculas nitrogenadas, o por microorganismos del suelo para obtener energía. Estos microorganismos son tan abundantes y activos que casi todo el NH_4^+ es oxidado a NO_3^- , proceso conocido como **nitrificación** (figura 7).

Las plantas y muchas bacterias pueden reducir rápidamente el NO_3^- a NH_4^+ por acción de la NR y NiR. El NH_4^+ así formado pasa a formar parte de los aminoácidos de las plantas, que son usados por los animales para sintetizar sus propias proteínas. Cuando los animales ingieren vegetales degradan las proteínas y los aminoácidos resultantes son usados por los animales para sintetizar sus propias proteínas. La degradación de restos animales y

vegetales permite el retorno del NH_4^+ al suelo, donde las bacterias nitrificantes convierten la mayor parte de éste en NO_3^- (figura 7).

El balance entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico es mantenido por bacterias que convierten el NO_3^- a N_2 . Este proceso llamado **desnitrificación**, se da en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas y es realizado por diferentes bacterias del suelo, que usan NO_3^- como aceptor final de electrones para producir ATP.

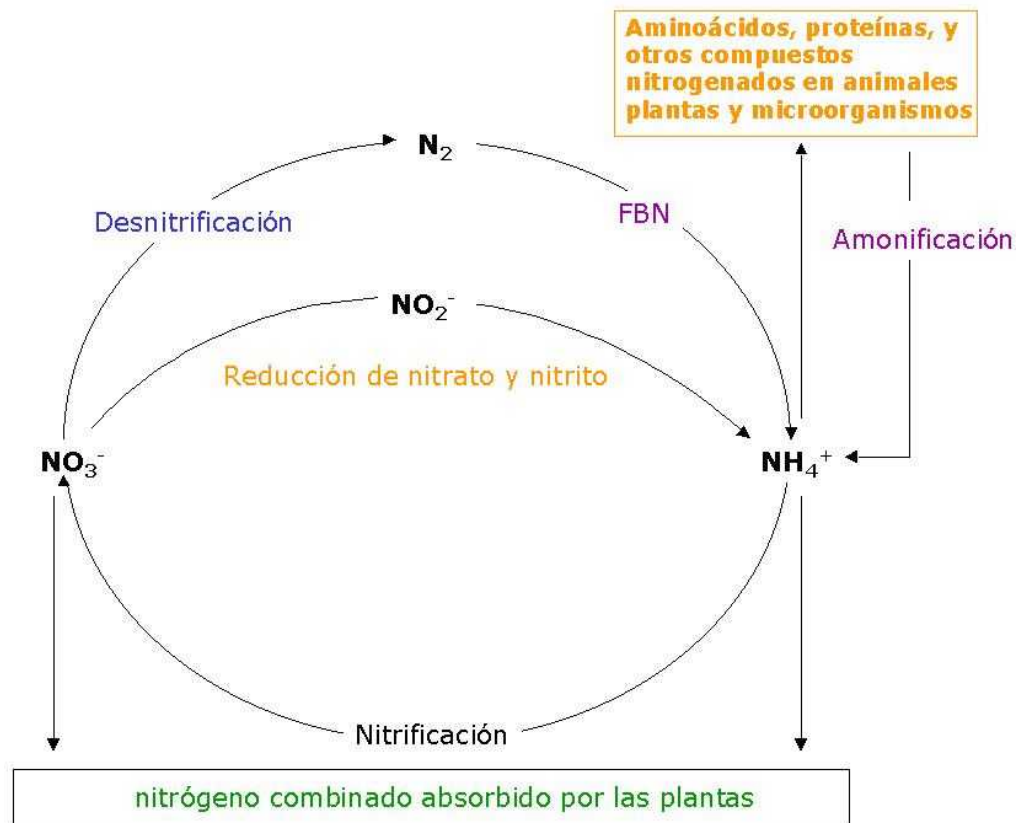


Figura 7. **Ciclo del nitrógeno**. Esta representación de la dinámica del nitrógeno en el suelo y en la atmósfera relaciona sus diferentes estados redox. En estos cambios de estado de oxidación participan enzimas presentes en microorganismos y plantas. Las plantas absorben NO_3^- y NH_4^+ . El NO_2^- no es absorbido por las plantas y el N_2 debe ser reducido a amonio por procariontas antes de ser utilizado por las plantas que no pueden realizar ese proceso conocido como FBN.