

METABOLISMO DE NITROGENO EN PLANTAS

Material elaborado por: P. Díaz, O. Borsani, S. Signorelli y J. Monza.

Las transaminasas transfieren grupos aminos

- Las reacciones de transaminación catalizadas por transaminasas son centrales en el metabolismo aminoacídico porque a través de ellas se sintetizan y se degradan los aminoácidos. Es decir, estas enzimas que catalizan la transferencia del grupo amino del carbono α de un aminoácido al carbono α de un cetoácido, permiten sintetizar aminoácidos a partir de cetoácidos y viceversa (figura 1).
- 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 1A) 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 (figura 1A).
- La reversibilidad de las reacciones de transaminación permite ajustes de acuerdo a la demanda de aminoácidos, aunque algunas transaminasas tienden a actuar principalmente en una dirección.

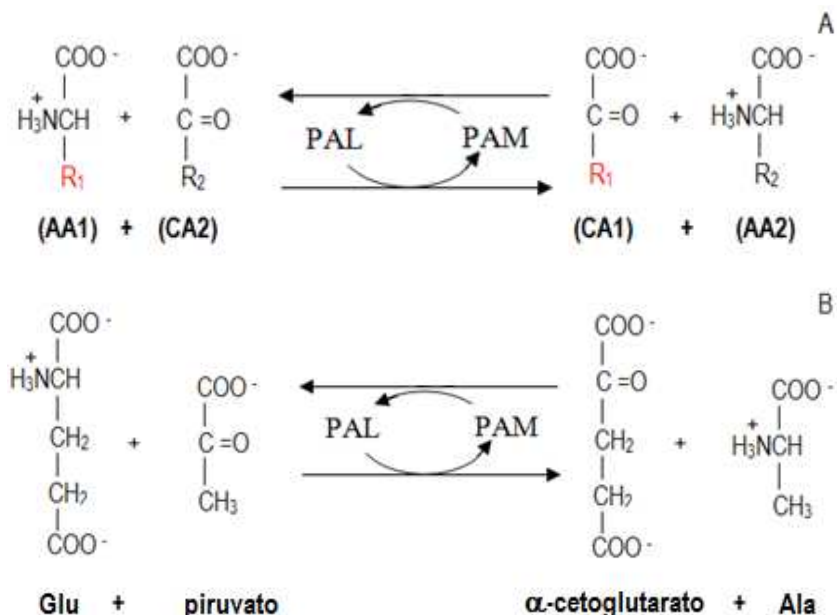
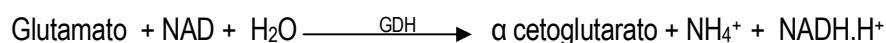


Figura 1. En **A** reacción general de transaminación que muestra como un aminoácido (AA1) se transforma en un cetoácido (CA1) y como el cetoácido (CA2) se transforma en un aminoácido (AA2). En este proceso se requiere de un cofactor el PAL/PAM que funciona como aceptor o donador del grupo amino. En **B** se representa un ejemplo concreto de transaminación glutamato - piruvato.

Los aminoácidos pueden perder el grupo amino por desaminación oxidativa

La desaminación oxidativa es un proceso común a todos los aminoácidos que consiste en la pérdida de un grupo amino.

- Un ejemplo es el glutamato que es desaminado oxidativamente en la mitocondria de mamíferos por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que utiliza NAD como cofactor.



- En animales ureotélicos el amonio liberado por esta reacción forma carbamil fosfato y se elimina en forma de urea (figura 7).
- En las plantas, en hojas en senescencia las proteínas son degradadas y los aminoácidos resultantes se transaminan para dar glutamato, que a su vez se desamina por acción de la GDH. El NH_4^+ resultante es asimilado por la GS e incorporado a compuestos que transportan nitrógeno, como la asparragina, arginina o ureidos (figura 4), que son aprovechados en otras partes de la planta.

Fuentes de nitrógeno de las plantas

El nitrógeno forma parte de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos y clorofilas, entre otras moléculas y es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de las plantas.

- Las fuentes de nitrógeno utilizadas por las plantas son el NH_4^+ y el NO_3^- , este último la forma de nitrógeno combinado más abundante en los suelos.
- Las raíces de las plantas absorben NO_3^- y NH_4^+ del suelo (figura 2). Las leguminosas noduladas por bacterias colectivamente llamadas rizobios, pueden además usar el N_2 atmosférico dado que los rizobios son capaces de reducir el N_2 a NH_4^+ (figura 2 y 5A). Este proceso es conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN).
- El NH_4^+ , proveniente de la reducción del NO_3^- o de la FBN es asimilado, es decir, pasa a formar parte de moléculas orgánicas.
- La figura 2 resume los tres procesos involucrados en la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno: absorción, reducción y asimilación.

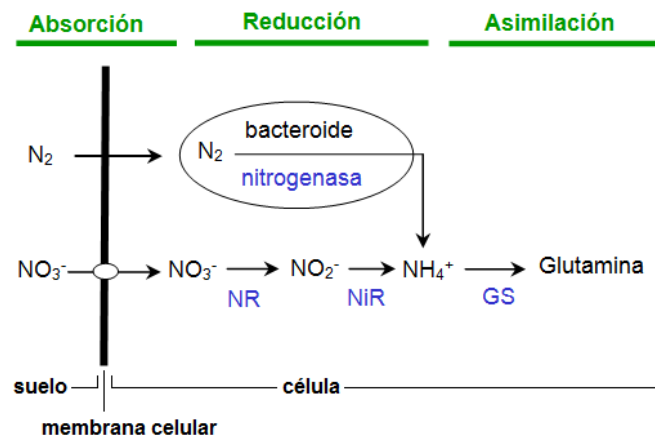


Figura 2. Esquema de las etapas que involucran el pasaje de NO_3^- y de N_2 a una forma orgánica, la glutamina. NR, NiR y GS corresponden a las enzimas Nitrato Reductasa, Nitrito Reductasa y Glutamina Sintetasa respectivamente. El N_2 es reducido por la nitrogenasa, proceso conocido como FBN.

Absorción

- Las plantas absorben NO_3^- desde el suelo y son capaces de mantener concentraciones mayores de este ión en sus células o en la savia xilemática. Para esto, el NO_3^- atraviesa la membrana plasmática de células epiteliales de la raíz mediante transportadores específicos con gasto de ATP.
- En la mayoría de las plantas existen dos tipos de transportadores; los constitutivos con una K_M alta para el NO_3^- , y los inducibles con una K_M baja: son transportadores de baja y alta afinidad respectivamente.

- Una evidencia acerca de la existencia de transportadores inducibles por el NO_3^- , es que la absorción de este ión desciende en presencia de inhibidores de la síntesis proteica.
- El transporte de NO_3^- es dependiente de ATP, por lo que decrece con bajas $p\text{O}_2$ en el entorno radicular, así como en presencia de inhibidores o desacopladores de cadena respiratoria.

Reducción del nitrato a amonio

- El NO_3^- puede ser reducido en las células de las raíces, o bien en tallos y hojas (figura 3). La contribución relativa de los distintos órganos en la reducción del NO_3^- varía con la especie: en plantas tropicales la reducción ocurre preferentemente en el tallo y en las hojas, y en las de clima templado en las raíces.
- A nivel celular, las plantas en general acumulan el NO_3^- 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 citoplasmática catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR) que reduce el nitrato a nitrito y otra plástidica catalizada por la nitrito reductasa (NiR) que reduce el nitrito a amonio (figura 3).

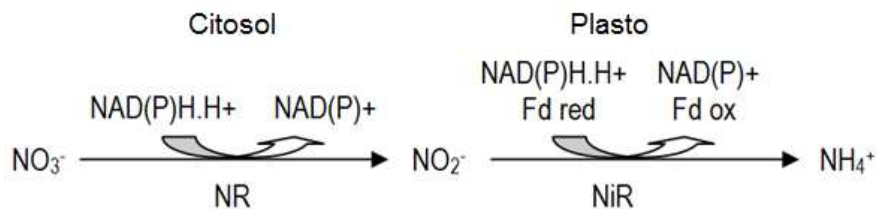


Figura 3. Reducción de NO_3^- a NH_4^+ catalizada por la nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR). El NAD(P)H.H y la Fd red son las fuentes de poder reductor.

- La NR citosólica usa NADH.H o NADPH.H como donador de electrones, mientras que la NiR que es una enzima de localización plástidica emplea ferredoxina reducida (Fd red) o NADPH.H.
- Cuando a una planta se le suministra NO_3^- , aumenta la cantidad y actividad de proteína NR en hojas y raíces. El aumento de la cantidad de NR se debe a la síntesis *de novo* de la enzima, y en plantas es uno de los ejemplos más conocidos de inducción de la síntesis de una enzima por su sustrato.
- La NiR, codificada por un gen nuclear, es sintetizada en el citoplasma como una proteína precursora, y tiene una secuencia N-terminal que corresponde a un péptido señal que determina su ingreso al los plastos.

Las plantas asimilan el nitrógeno bajo la forma de amonio

La asimilación de nitrógeno consiste en la incorporación del NH_4^+ a moléculas orgánicas. El NH_4^+ puede ser absorbido como tal, de la reducción del NO_3^- que las plantas absorben, o del N_2 atmosférico que bacterias asociadas a plantas son capaces de reducir (figura 2 y 6).

- En los tejidos vegetales prácticamente la totalidad del nitrógeno es asimilado por una reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS), seguida de otra reacción catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT), una amido transferasa. Las reacciones se resumen en la figura 4.
- La GS cataliza la incorporación del NH_4^+ al glutamato para dar glutamina (figura 4) en una reacción que requiere ATP. El bajo K_M de la GS para el NH_4^+ asegura su inmediata asimilación, lo que evita que este ión tóxico, quede libre en la célula.
- La reacción que sigue es catalizada por la GOGAT, enzima que utiliza como cofactores al NAD(P)H.H⁺ o ferredoxina reducida. En esta reacción el grupo amida de la glutamina es transferido al α cetoglutarato para dar dos moléculas de glutamato (figura 4). Un glutamato es un aceptor de NH_4^+ cerrándose así el

“Ciclo GS/GOGAT” y el otro glutamato se usa para la síntesis de aminoácidos mediante aminotransferasas (figura 4).

- La GS y la GOGAT se encuentran bajo distintas isoformas en todos los tejidos de la planta.

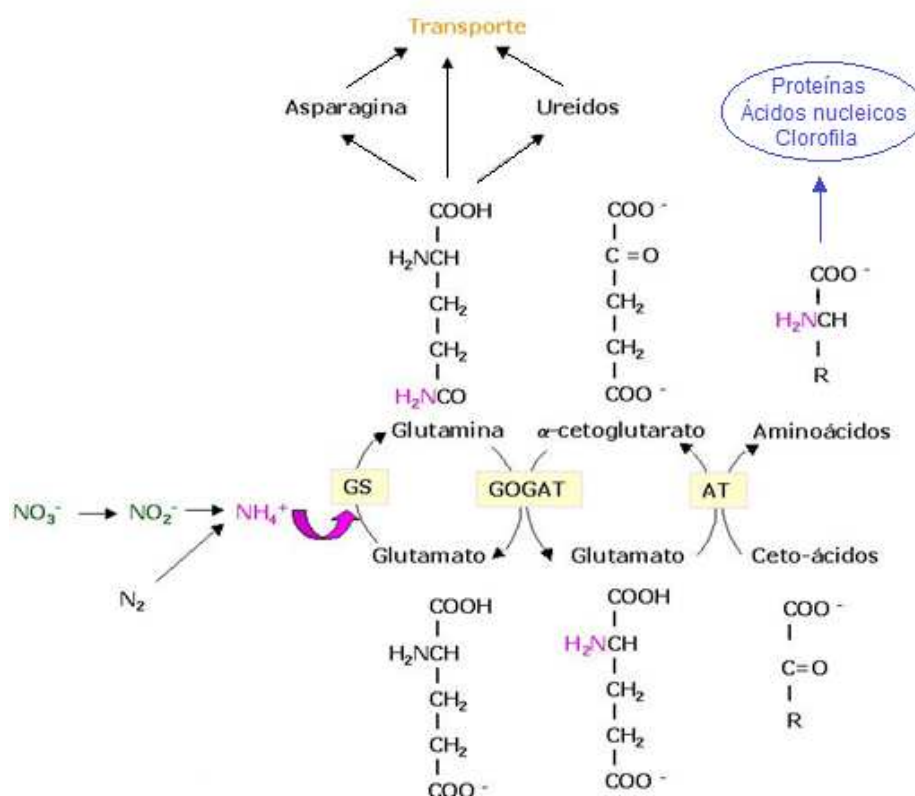


Figura 4. Esquema de la asimilación de NH₄⁺ en plantas por el ciclo GS/GOGAT, de sus diferentes orígenes y de algunas moléculas organonitrogenadas que participan en su transporte.

Las plantas se benefician de bacterias que reducen el nitrógeno atmosférico

La capacidad de fijar nitrógeno está restringida a un número escaso de procariontes que reducen enzimáticamente el N₂ a NH₄⁺, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno o diazotrofia. Este proceso lo realizan bacterias en simbiosis con leguminosas como los rizobios (figura 5 A), o “en vida libre” como muchas cianobacterias (figura 5 B) y *Azotobacter* entre otros. En la tabla 1 se resume la capacidad de fijar nitrógeno de microorganismos con importancia agronómica.

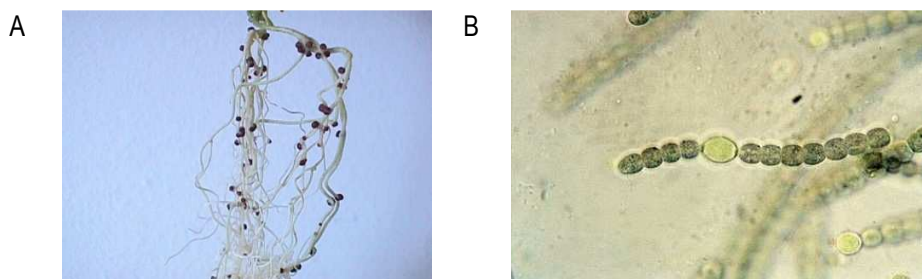


Figura 5. A: nódulos inducidos por rizobios en raíces de una leguminosa. B: cianobacteria fijadora de nitrógeno en vida libre, el ejemplar mostrado es del género *Anabaena* y fue aislado de arrozales de INIA Treinta y Tres.

- Por la reacción que aparece abajo, catalizada por la nitrogenasa, se estima que se incorporan a la biosfera a nivel global, unas 10^8 ton/año de N_2 .



- La reacción catalizada por la nitrogenasa es fuertemente endergónica, y la enzima se inhibe cuando en el medio hay nitrógeno combinado (NO_3^- o NH_4^+). Este mecanismo de regulación es "lógico" en la medida que la utilización de esas formas de nitrógeno requieren menos energía que el proceso de FBN.
- Las bacterias simbióticas generan el ATP a partir de moléculas carbonadas derivadas de la fotosíntesis, que la planta les proporciona. A su vez, las bacterias le suministran amonio a la planta. Esta relación entre individuos de distinta especie en la que ambos se benefician se conoce como simbiosis.

Tabla 1. Cantidad en Kg por ha de nitrógeno fijado por bacterias diazotrofos en vida libre y en simbiosis.

Cianobacterias	25
Azospirillum	12
Rizobio-soja	90
Rizobio-lotus	100
Rizobio-alfalfa	200

Panorámica de los procesos de absorción, reducción y asimilación en una planta

- En la figura 6 se resumen los procesos relacionados con el metabolismo de moléculas nitrogenadas en una planta. La presencia de nódulos donde ocurre la fijación de nitrógeno es propio de las leguminosas.

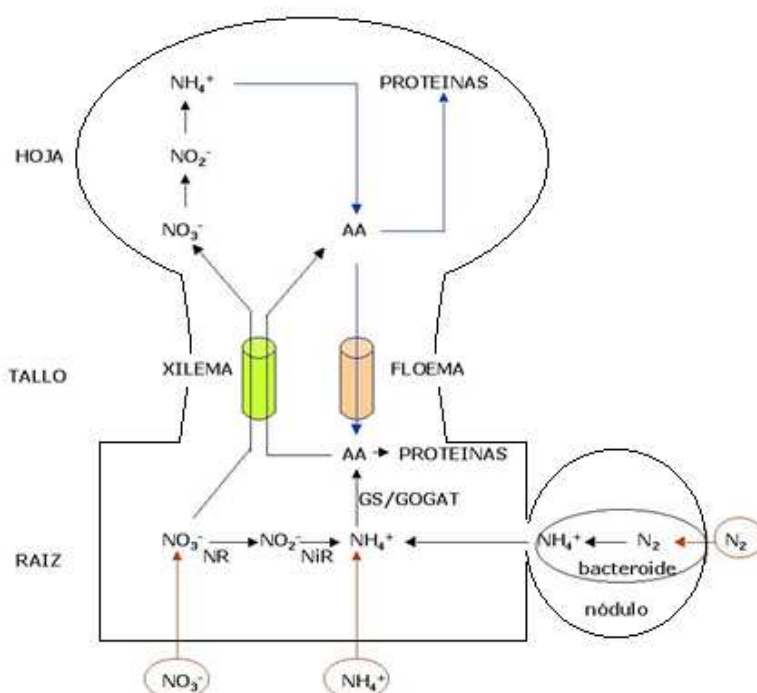


Figura 6. El NO_3^- y el NH_4^+ son las formas de nitrógeno combinado absorbidas por las plantas. A su vez, en las leguminosas, el N_2 atmosférico puede ser reducido a NH_4^+ por los bacteroides que se encuentran en los nódulos de la raíz. El NH_4^+ asimilado en la raíz es traslocado a diferentes órganos de la planta por el xilema. El NO_3^- puede ser reducido en la raíz o transportado a la hoja por el xilema para ser asimilado en otros órganos.

Ciclo de la urea

El ciclo de la urea es una vía metabólica que se da en animales, plantas, hongos y bacterias según las mismas reacciones, pero el significado biológico de la vía tiene diferencias según el organismo. Los pasos que conducen a la síntesis de urea a partir del glutamato se describen abajo, y en la figura 7 se resume este ciclo.

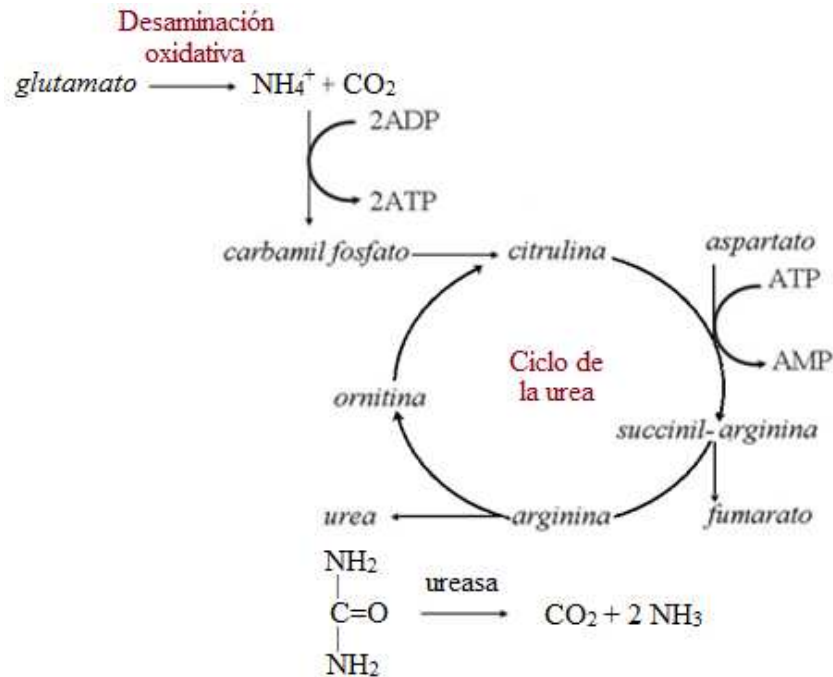


Figura 7. Esquema del ciclo de la urea. Este ciclo se utiliza para la síntesis de arginina. Se representa la urea hidrolizada por la ureasa.

- El amonio liberado por desaminación oxidativa del glutamato es incorporado a una molécula de CO₂ con gasto de ATP, reacción que produce el carbamil fosfato.
- Esta molécula se condensa con la ornitina y rinde citrulina, dando origen a una ruta conocida como Ciclo de la urea, que incluye también la síntesis de la arginina (figura 7). De esta forma, el amonio liberado por desaminación oxidativa del glutamato ahora se encuentra en la citrulina.
- La citrulina obtiene del aspartato el grupo amino y rinde succinil-arginina con gasto de 2 ATP.
- La conversión de succinil-arginina en arginina se logra por la liberación de un fumarato, que puede ingresar al Ciclo de Krebs. La arginina es la principal fuente de almacenamiento nitrogenado en plantas y constituye el 40% del nitrógeno en proteínas de semillas.
- La enzima arginasa permite que el ciclo se cierre con la liberación de urea. La urea tiene distintos destinos, en los animales ureotélicos es una forma de eliminar el amonio y en plantas es una molécula de reserva y movilización de nitrógeno.
- Las plantas y los microorganismos poseen la enzima ureasa que hidroliza la urea en amonio y CO₂. El NH₄⁺ liberado es reasimilado por el ciclo GS/GOGAT.

El glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos

La síntesis de fenilalanina, triptófano y tirosina en las plantas se logra a través de las mismas reacciones (figura 8). A su vez estos aminoácidos permiten la síntesis de otras moléculas con diferentes funciones en las plantas tales como la hormona vegetal ácido indol acético, antocianos, lignina, entre otras.

- Esta vía presenta particular interés porque la enzima 5 enolpiruvato siquimato sintasa 3P (EPSP sintasa) es inhibida competitivamente por el glifosato (figura 8). El glifosato es el principio activo del herbicida Roundup®.
- En la posibilidad de inhibir esa enzima por glifosato se basó la construcción de plantas transgénicas con resistencia a ese herbicida.
- Las plantas transgénicas pueden llevar una forma del gen EPSP sintasa mutado que no reconoce al glifosato.

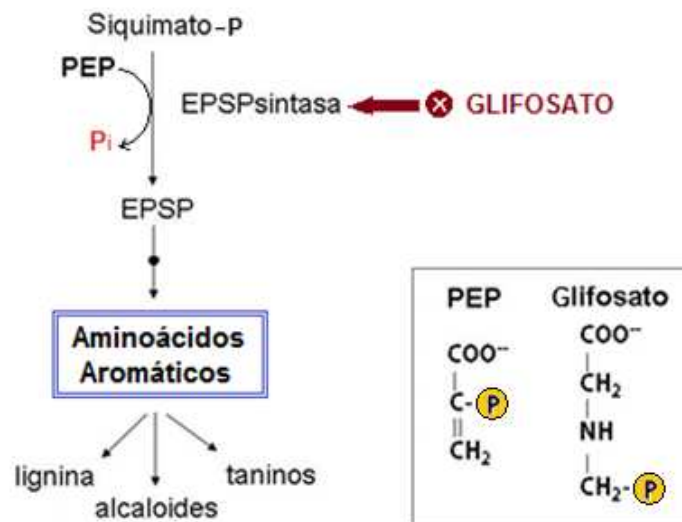


Figura 8. Inhibición por glifosato de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. La flecha la enzima inhibida por el herbicida (EPSP sintasa). En el recuadro se representan las estructuras de las moléculas que compiten por el sitio activo de la EPSP sintasa.

Bibliografía

- J. Monza, A. Márquez. Metabolismo de nitrógeno en las plantas. Editorial Almuzara. 2004
 Nelson y Cox, Lehninger principios de bioquímica. Editorial Omega. Ediciones varias.