

Asimilación del nitrógeno en plantas

Ing. Agr. María Pereyra Cardozo
Facultad de Agronomía
Universidad de La Pampa

2001

Asimilación del nitrógeno en plantas

Las plantas superiores son organismos autotróficos que pueden sintetizar sus componentes moleculares orgánicos a partir de nutrientes inorgánicos obtenidos del medio ambiente. Para muchos nutrientes minerales, este proceso involucra la absorción por las raíces desde el suelo y la incorporación en compuestos orgánicos que son esenciales para el crecimiento y desarrollo. Esta incorporación de nutrientes minerales en sustancias orgánicas tales como pigmentos, enzimas, cofactores, lípidos, ácidos nucleicos o aminoácidos se denomina asimilación de nutrientes.

La asimilación del nitrógeno requiere una serie compleja de reacciones bioquímicas con un alto costo energético. En la asimilación del nitrato (NO_3^-), el nitrógeno del NO_3^- es convertido en una forma de energía superior, nitrito, (NO_2^-), luego en una mayor forma de energía, amonio, (NH_4^+) y finalmente en nitrógeno amídico en la glutamina. Este proceso consume 12 equivalentes de ATPs por molécula de nitrógeno. Por otra parte, las leguminosas que presentan una forma simbiótica con bacterias que transforman el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio; proceso denominado, fijación biológica del nitrógeno junto con la subsecuente asimilación del amonio en los aminoácidos, consume 16 ATPs por nitrógeno.

La mayoría de los compuestos presentes en las células vegetales contienen nitrógeno, tales como: aminoácidos, nucleósidos fosfatos, componentes de fosfolípidos, clorofila. Solamente el oxígeno, carbono, y el hidrógeno son elementos más abundantes en las plantas que el nitrógeno. La mayoría de los ecosistemas naturales y agrícolas, al ser fertilizados con nitrógeno inorgánico, muestran importantes incrementos en la productividad, poniendo en evidencia la importancia de este elemento.

Ciclo biogeoquímico del nitrógeno

El nitrógeno está presente en diferentes formas en la biosfera (Figura 1). La atmósfera contiene aproximadamente un 78 % de nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, la mayor parte de este gran reservorio de nitrógeno no está directamente disponible para los organismos. La adquisición del nitrógeno de la atmósfera requiere la ruptura del enlace triple covalente entre dos átomos de nitrógeno ($\text{N}=\text{N}$) para producir amonio. Estas reacciones de fijación del nitrógeno, pueden ser procesos naturales o industriales, fijando el proceso natural aproximadamente $190 \times 10^{12} \text{ g año}^{-1}$ de nitrógeno (Cuadro 1).

Cuadro 1. Los principales procesos del ciclo biogeoquímico del nitrógeno

Proceso	Definición	ritmo ($10^{12} \text{ g año}^{-1}$)
Fijación industrial	Conversión industrial de nitrógeno molecular a amonio	80
Fijación atmosférica	Conversión fotoquímica de nitrógeno molecular en nitrato	19
Fijación biológica	Conversión procariótica de nitrógeno molecular a amonio	170
Absorción por plantas	Absorción y asimilación por las plantas del nitrato o amonio	1200
Inmovilización	Absorción microbiana y asimilación del amonio o nitrato	N/C
Amonificación	Catabolismo de la materia orgánica del suelo a amonio (bacterias y hongos)	N/C
Nitrificación	Oxidación del amonio a nitrito (<i>Nitrosomonas</i> sp.) y oxidación de nitrito a nitrato (<i>Nitrobacter</i> sp.)	
Mineralización	Catabolismo de la materia orgánica del suelo a nitrógeno mineral a través de la amonificación o nitrificación (bacterias y hongos)	
Volatilización	Pérdida física de amoníaco gaseoso a la atmósfera	100
Fijación de amonio	Fijación física de amonio en las partículas del suelo	10
Denitrificación	Conversión del nitrato en nitrógeno molecular (bacterias)	210
Lixiviación de nitrato	Flujo físico de nitrato disuelto en el agua del suelo	36

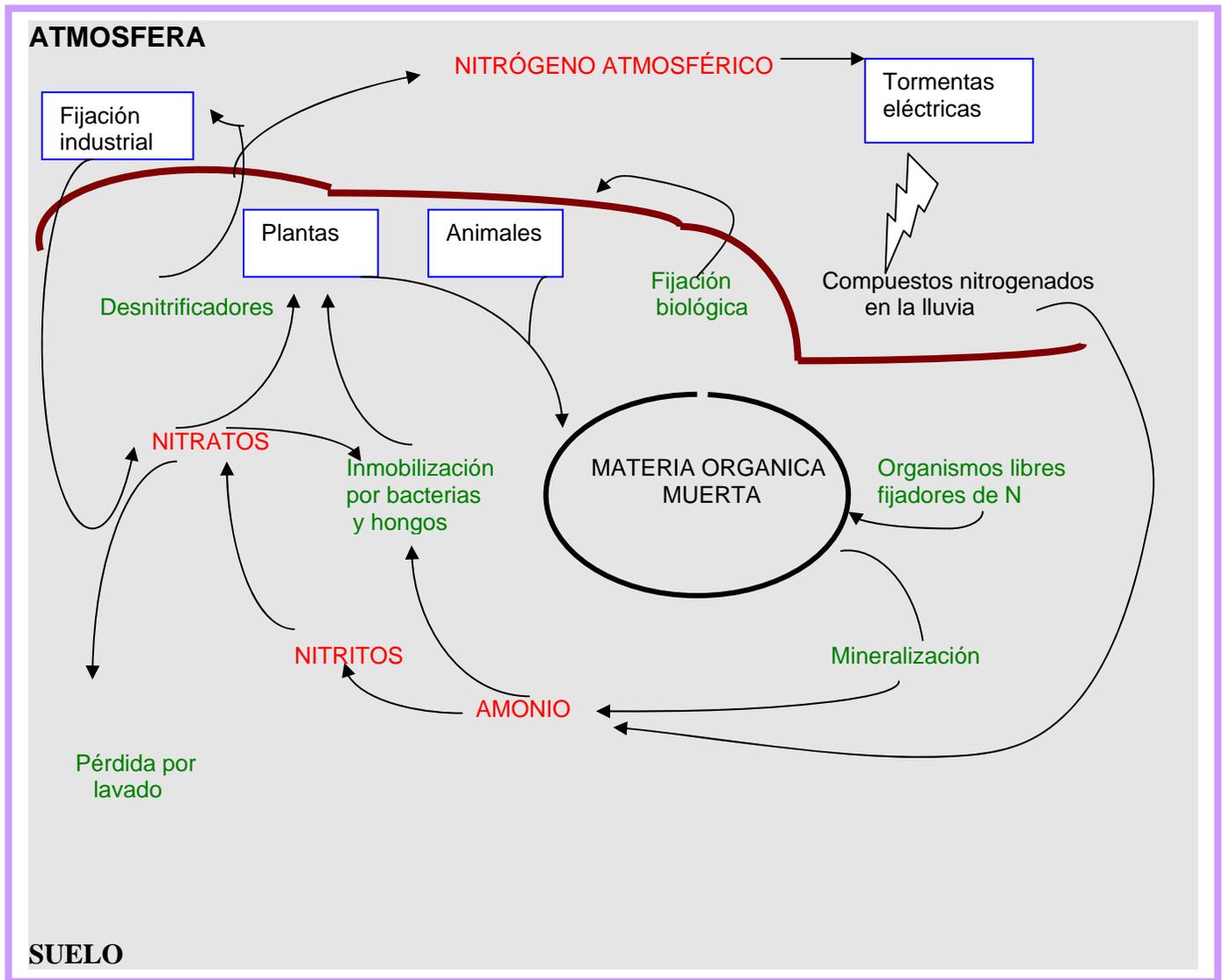


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Taiz and Zeiger, 1998).

Absorción del nitrato por las raíces

La absorción de NO_3^- está sujeta a una regulación positiva o de inducción y negativa. La última parece depender del nivel de N de la planta. Ha sido sugerido que el ciclo de los aminoácidos entre los tallos y las raíces sirve para proveer la información necesaria respecto del nivel de N en la planta, que le permite a las raíces regular la absorción de N (Cooper and Clarkson, 1989).

El transporte de NO_3^- al citoplasma a través del plasmalema es un proceso termodinámicamente desfavorable, tanto en términos de gradiente de potencial eléctrico (interior negativo) y un gradiente de potencial químico $[\text{NO}_3^-]_{\text{ext}} < [\text{NO}_3^-]_{\text{cit}}$. Lo último está basado en estimaciones de la $[\text{NO}_3^-]_{\text{cit}}$ las que varían entre 5-30 mM, mientras que los valores de $[\text{NO}_3^-]$ del suelo varían entre 0.1 y 1.0 mM (Henriksen and Spanswick, 1993).

La absorción del NO_3^- en las plantas terrestres está mediado al menos por tres sistemas de transporte que coexisten en las membranas plasmáticas de las células radicales. Estos sistemas pueden ser divididos en dos clases, referidos como sistemas de transporte de alta (STAA) y baja afinidad (STBA) por el NO_3^- (baja y alta K_m , respectivamente). Por otra parte, los STAA pueden ser constitutivos

(STAAC) o inducibles (STAAI). Los STBA están involucrados en la absorción de altas concentraciones de NO_3^- ($> 0.2\text{mM}$), mientras que los STAAI y los STAAC están saturados con una baja concentración de NO_3^- externa (aproximadamente $100\ \mu\text{M}$) (Figura 2). En raíces de cebada, la actividad de los STBA es expresada sin una exposición previa al NO_3^- y este sistema de transporte estaría regulado negativamente por el nitrógeno acumulado en la planta (Vidmar *et al.* 2000).

El movimiento pasivo del nitrato a través de las membranas plasmáticas es probablemente vía canales iónicos; un canal permeable al nitrato el cual permite el flujo de aniones hacia la célula ha sido identificado en la membrana plasmática de protoplastos de trigo. Tal canal podría tener un rol en el sistema de absorción constitutivo. Aparentemente aunque la absorción pasiva sólo produzca concentraciones micromolares de nitrato en el citoplasma, éstas serían suficientes para inducir el transporte y asimilación del nitrato, sin la necesidad de un receptor de nitrato fuera de la célula (figura 3) (Miller and Smith, 1996).

Un canal de aniones también puede ser el mecanismo para la salida de nitrato. La dirección del flujo de aniones a través de un canal está determinada por el gradiente electroquímico del ión. La regulación de la actividad de un canal aniónico en la membrana plasmática podría ser importante en determinar la concentración de nitrato en el citoplasma, dado que si el transporte activo se mantiene, la salida a través del canal disminuirá rápidamente la concentración de nitrato en el citoplasma. Un canal abierto tiene una permeabilidad selectiva permitiendo que algunos iones fluyan pasivamente en función del gradiente electroquímico a un gran ritmo (10^6 - 10^8 iones seg^{-1}). Un simple canal de aniones abierto con un ritmo de salida de 10^7 iones seg^{-1} permitirá la caída de la concentración de nitrato citoplasmático de $4\ \text{mol m}^{-3}$ a un valor de mmol m^{-3} (distribución pasiva del nitrato) en 50 – 200 segundos.

Por otra parte, el transporte activo es requerido en las membranas plasmáticas para mantener la concentración intracelular de nitrato. La fuerza protón motriz a través de la membrana plasmática puede proveer la energía necesaria para el transporte de nitrato. Se considera que el transporte de nitrato es un simporte con H^+ (figura 3).

Las proteínas de los STAAI, son de 507 a 509 aminoácidos, con una masa molecular de 54 a 55 kD, incluyendo 12 regiones hidrofóbicas (transmembranas). Ha sido mostrado que el nivel de ARNm de estas proteínas aumenta rápidamente en respuesta al suministro de NO_3^- en plantas que crecían en condiciones con limitaciones de NO_3^- . El incremento en el nivel de transcriptos está correlacionado con el incremento en el ingreso de NO_3^- . Los genes involucrados en la adquisición y reducción del NO_3^- fueron coordinadamente expresados bajo condiciones de inducción por NO_3^- . Por otra parte, la abundancia de los transcriptos está regulada por un efecto feedback de las formas reducidas del nitrógeno más que por el nivel de nitrato. A nivel fisiológico la inhibición de los STAAI en un bajo estado estacionario después de alcanzar un pico de inducción ha sido argumentado que es el resultado de efectos de la acumulación de NO_3^- y/o los productos de su asimilación. Esta conclusión está basada en correlaciones entre la $[\text{NO}_3^-]$ en la célula y el ingreso de NO_3^- . Existen evidencias que el ingreso de $[\text{NO}_3^-]$ es inhibido por el NH_4^+ celular y/o los aminoácidos. Siendo regulado la absorción de nitrógeno por el ciclo de los aminoácidos entre la raíz, tallo y raíz (Cooper and Clarkson, 1989) (Figura 4).

Mecanismos de transporte en el tonoplasto

Análisis de vacuolas aisladas de hojas de cebada han demostrado que entre el 58% y 99 % del nitrato protoplástico se encuentra en la vacuola. En consecuencia, un transporte activo es necesario para explicar la concentración de nitrato dentro de la vacuola, siendo aparentemente un antiporte $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$, mientras que un canal abierto permitiría la salida pasiva del ión nitrato hacia el citoplasma. En consecuencia el control de la concentración de nitrato en el citoplasma ocurre por una "liberación" más que por un bombeo. Dicha regulación podría requerir una interacción directa entre el nivel de nitrato en el citoplasma y la actividad del canal, probablemente por la fosforilación del canal permitiendo su apertura (Miller and Smith, 1996).

Asimilación del nitrato

Las plantas asimilan la mayor parte del nitrato absorbido por sus raíces en compuestos orgánicos nitrogenados. La primera etapa de este proceso es la reducción de nitrato a nitrito en el citoplasma. La enzima nitrato reductasa (NR) cataliza la siguiente reacción:

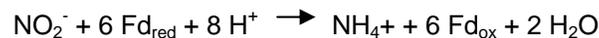


$$\Delta G = - 34.2 \text{ Kcal/mol}; \Delta E = 0.74 \text{ voltios}$$

en la que se observa un gran cambio de energía libre bajo condiciones estándar, siendo una reacción irreversible. La NR – NADPH (Ec. 1.6.6.1) está presente en las plantas superiores y en algas, las formas NAD(P)H se encuentran en algas, hongos y plantas superiores y la forma específica de NADPH se encuentra en hongos. En las hojas la NR es NADH dependiente, mientras que en la raíz existen dos formas NADH y NADPH dependientes. La nitrato reductasa cataliza el primer paso de la asimilación del nitrato en todos estos organismos, el cual parece ser el proceso que limita la adquisición de N en la mayoría de los casos, siendo esta enzima regulada por el NO_3^- y la luz entre otros factores.

La enzima NR es un homodímero compuesto de 2 subunidades idénticas de 100 kDa aproximadamente cada una, conteniendo cada subunidad tres grupos prostéticos: un equivalente de FAD (flavina adenina dinucleótido), hemo-Fe y un complejo de Molibdeno (Mo) . El molibdeno está unido a la enzima por un complejo orgánico llamado pterina formando el Mo-molibdoterina (Mo-MPT). En consecuencia, la enzima contiene tres cofactores internos: FAD, hemo y MPT y dos iones metálicos: Fe y Mo en cada subunidad (Figura 5). Durante el recambio catalítico el FAD, el Fe y el Mo son cíclicamente reducidos y oxidados, de manera que la NR existe en formas reducidas y oxidadas. Los potenciales redox para el FAD, hemo-Fe y Mo-MPT son -272 a -287 mV, -123 a -174 mV y -25 a 15 mV, respectivamente. Este patrón redox es consistente con un flujo de electrones, dentro de la enzima desde el NADH con un potencial redox de -320 mV hasta el sitio activo donde se reduce el NO_3^- con un potencial redox de $+ 420$ mV. Por lo que, la NR es una proteína soluble que cataliza una reacción redox, involucra una cadena transportadora de electrones y tiene dos sitios activos físicamente separados, uno para el NADH para reducir el FAD al comienzo de la cadena transportadora de electrones y uno para reducir el nitrato por la MO-MPT.

Dado que el nitrito formado es altamente reactivo, siendo un ión potencialmente tóxico, las células vegetales lo transportan inmediatamente después de ser generado por la reducción del nitrato desde el citoplasma a los cloroplastos en las hojas, y a los plástidos en las raíces. En estas organelas la enzima nitrito reductasa reduce el nitrito a amonio, siendo la reacción que cataliza:

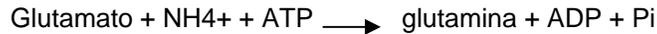


Donde Fd indica ferredoxina reducida (red) y oxidada (ox). La ferredoxina reducida deriva del transporte de electrones de la fotosíntesis en los cloroplastos y el NADPH generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfatos en los tejidos no fotosintéticos.

La nitrito reductasa es una proteína simple de 63 Kda y contiene dos grupos prostéticos, un complejo de Fe-S (Fe_4S_4) y un grupo hemo especializado. Experimentos cinéticos sugieren que el par Fe_4S_4 -hemo de la enzima se unen al nitrito y lo reducen directamente a amonio. De manera que el flujo de electrones desde la ferredoxina hasta el nitrito puede ser representado como se observa en la figura 6.

Asimilación del amonio

Las células vegetales evitan la toxicidad del amonio incorporándolo rápidamente en los esqueletos carbonados para formar aminoácidos (Figura 7 y 8). El paso primario de esta incorporación involucra las acciones secuenciales de la glutamina sintetasa y la glutamato sintetasa. La glutamina sintetasa (GS) combina el amonio con glutamato para formar glutamina:

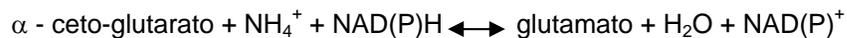


Esta reacción requiere la hidrólisis de un ATP e involucra cationes divalentes como el Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} como cofactores. La GS tiene un peso molecular de 350 kDa y está compuesta por 8 subunidades aproximadamente idénticas. La GS tiene una alta afinidad por el NH_4^+ siendo la K_m de 3-5 μM . Las plantas contienen dos clases de GS, una en el citoplasma y otra en los plástidos de las raíces o en los cloroplastos de tallos y hojas. Las formas citosólicas son expresadas durante la germinación de las semillas o en las células vasculares de raíces y tallos y producen glutamina para el transporte intracelular de nitrógeno. La GS en los plástidos de raíces genera nitrógeno amídico para su consumo; mientras que la GS de los cloroplastos de los tallos reasimila el NH_4^+ producido por fotorespiración. Al aumentar el nivel de glutamina aumenta la actividad de la glutamato sintasa (también conocida como glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa, o GOGAT). Esta enzima transfiere el grupo amida de la glutamina al α -ceto glutarato, dando 2 moléculas de glutamato. Las plantas contienen dos tipos de GOGAT, una que acepta los electrones del NADH, la otra acepta electrones de la ferredoxina:



La NADH-GOGAT está ubicada en los plástidos de los tejidos no fotosintéticos tales como las raíces o las células vasculares de hojas en desarrollo. En las raíces la NADH – GOGAT, está involucrada en la asimilación del NH_4^+ absorbida desde la rizosfera; en las células vasculares de las hojas en desarrollo la NADH – GOGAT asimila la glutamina translocada desde las raíces o de las hojas senescentes. La Fd – GOGAT se encuentra en los cloroplastos, tiene una masa molecular de 165 kDa y participa del metabolismo del nitrógeno de la fotorespiración.

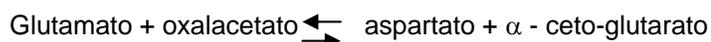
Otra enzima que participa en la asimilación del amonio es la glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual cataliza una reacción reversible, sintetiza o desamina el glutamato:



La forma NADH dependiente se encuentra en la mitocondria y la NADPH dependiente está ubicada en los cloroplastos de los órganos fotosintéticos. Aunque ambas formas son relativamente abundantes, sus roles específicos aún no han sido resueltos. Se sabe que la GDH no puede sustituir las reacciones GS – GOGAT para la asimilación del amonio y que la función primaria de la GDH es la desaminación del glutamato.

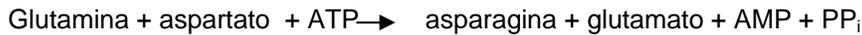
Reacciones de transferencia del nitrógeno

Una vez asimilado en nitrógeno en glutamina y glutamato, es incorporado en otros aminoácidos por reacciones de transaminación. Las enzimas que catalizan estas reacciones son aminotransferasas. Por ejemplo, la aspartato aminotransferasa (AAT) la cual cataliza la siguiente reacción:



En la cual el grupo amino del glutamato es transferido al aspartato. Las aminotransferasas se encuentran en el citoplasma, cloroplastos, mitocondrias, glioxisomas y peroxisomas. Las aminotransferasas localizadas en cloroplastos tienen un importante rol en la síntesis de aminoácidos, debido a que hojas de plantas o cloroplastos aislados expuestos a dióxido de carbono marcado, rápidamente incorporan el carbono marcado en glutamato, aspartato, alanina, serina y glicina.

La asparagina es una amida que no sólo es precursora de las proteínas, además es un componente clave del transporte y reserva de nitrógeno debido a su estabilidad y la alta relación nitrógeno/ carbono (2N /4C) respecto de 2N/ 5C, en la glutamina; o 1N/5C para el glutamato. La reacción de síntesis de la asparagina involucra la transferencia de un grupo amino de la glutamina al aspartato:



La enzima que cataliza dicha reacción es la asparagina sintetasa (AS), se encuentra en el citoplasma de las hojas y raíces. Bajo condiciones de alta intensidad de luz y carbohidratos, son estimuladas la GS y la GOGAT, e inhiben la AS, favoreciendo la asimilación del nitrógeno en glutamina y glutamato, compuestos que son ricos en carbono y participan en la síntesis de nuevo material vegetal. Mientras que condiciones de luz limitantes, inhiben la GS y la GOGAT y estimulan la AS y por lo tanto la asimilación del nitrógeno en asparagina, un compuesto que es rico en nitrógeno y suficientemente estable para ser transportado o almacenado.

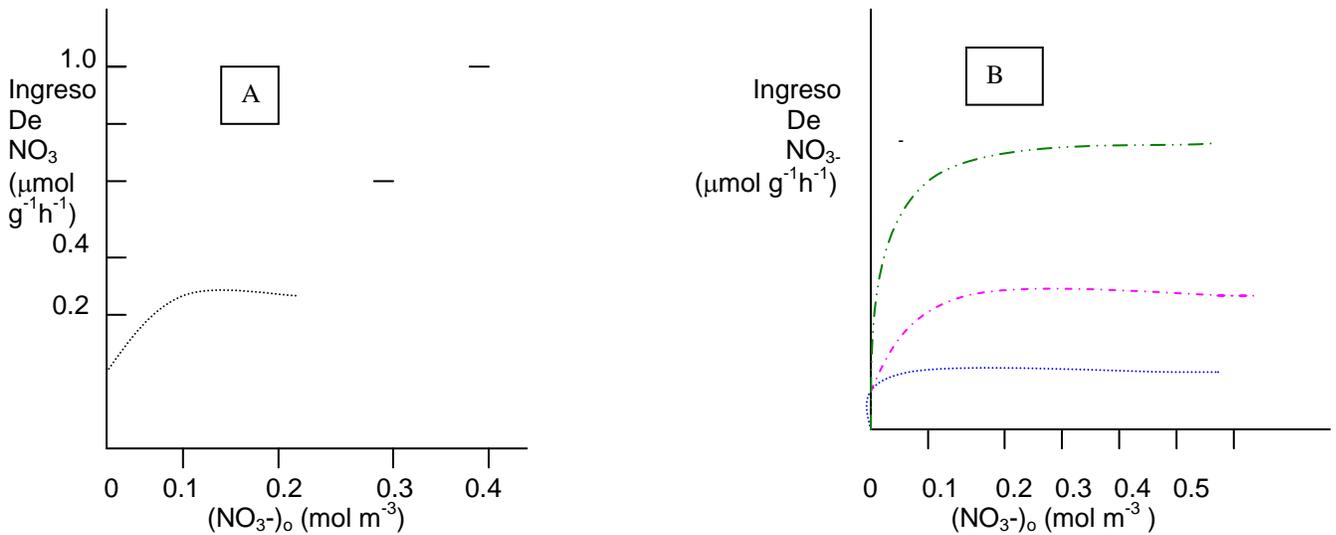


Figura 2. Ingreso de nitrato en raíces de plantas de cebada que no habían sido pretratadas con nitrato (A) y pretratadas con 0.1 mM de nitrato (B) durante un día. (---), 4 días (- - -), o con 10 mM de nitrato durante 4 días (— · —) (Lea and Leegood, 1993).

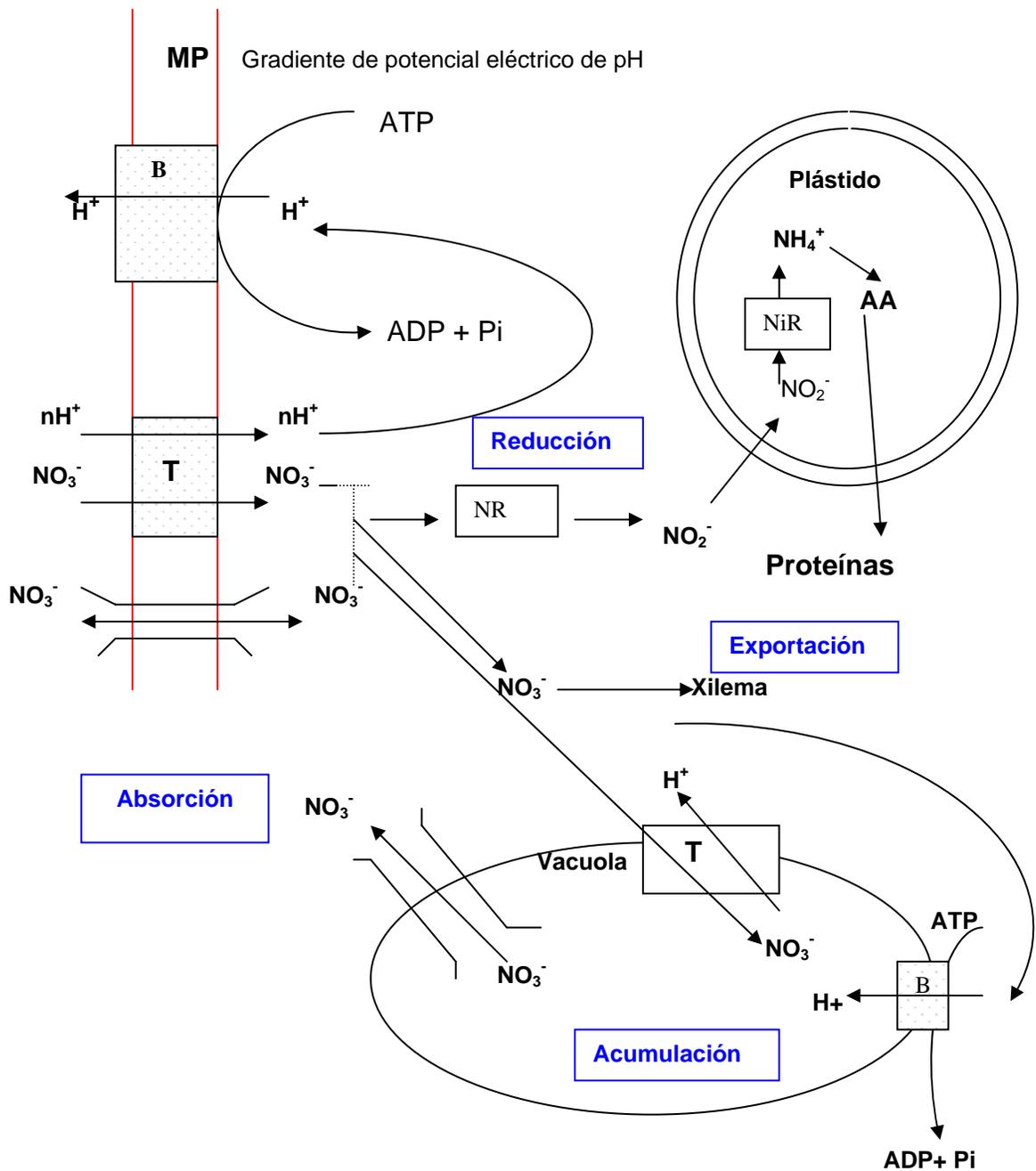


Figura 3. Representación esquemática del metabolismo del nitrato en la raíz. B: Atasa, bomba de protones; T: transportador; NR: nitrato reductasa; NiR: nitrito reductasa; MP: membrana plasmática; AA: aminoácidos (Morot-Gaudry, 1997) con modificaciones de la autora.

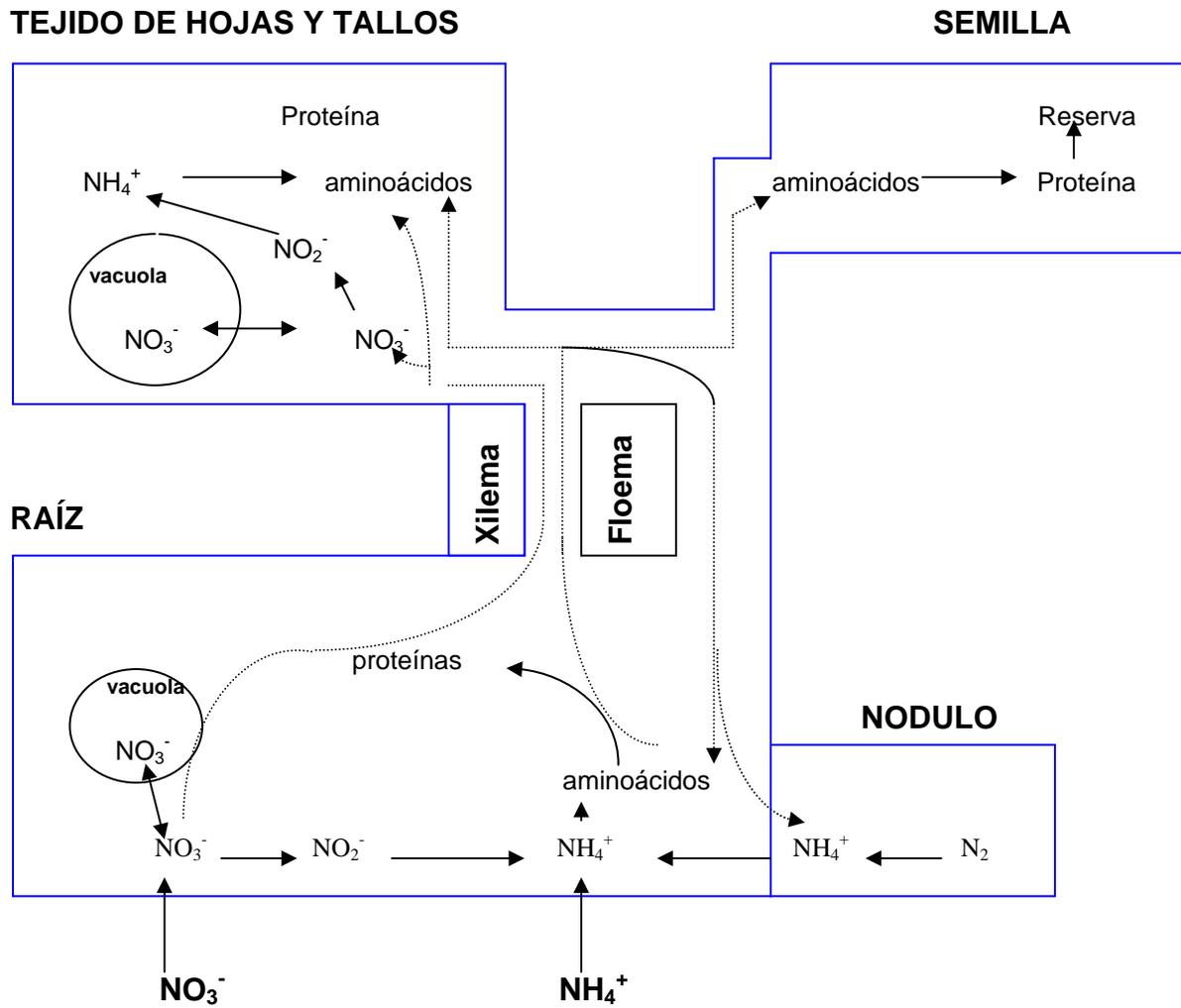


Figura 4. Absorción, reducción y acumulación de nitrato en los diferentes tejidos de la planta. Ciclo de los aminoácidos. (Lea and Leegood, 1993).

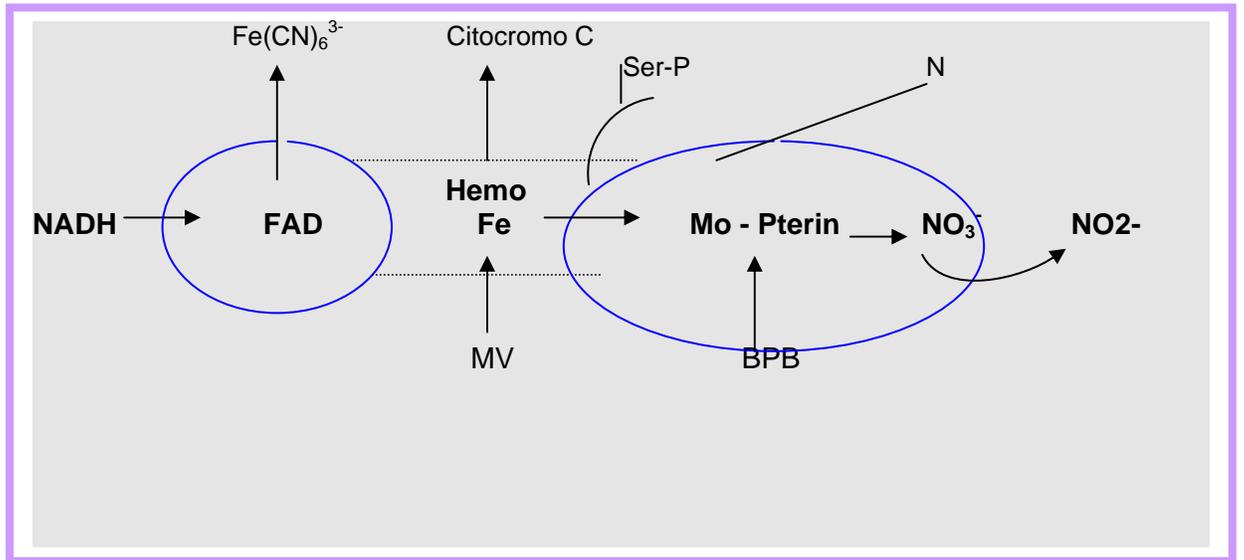


Figura 5. Modelo estructural de la nitrato reductasa (Campbell, 1999).

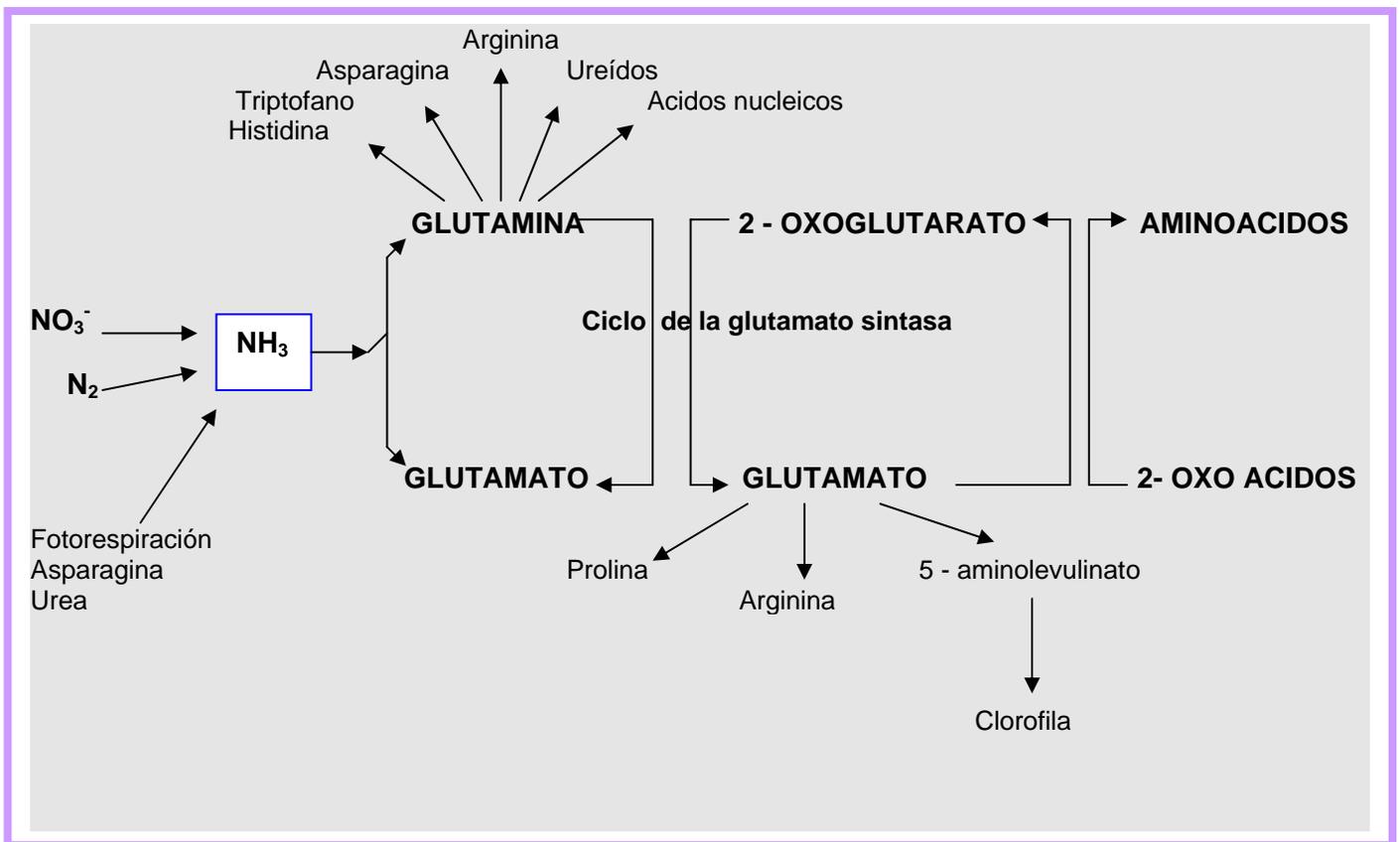


Figura 7. Asimilación del amonio en las plantas superiores, vía la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (Lea and Leegood, 1993).

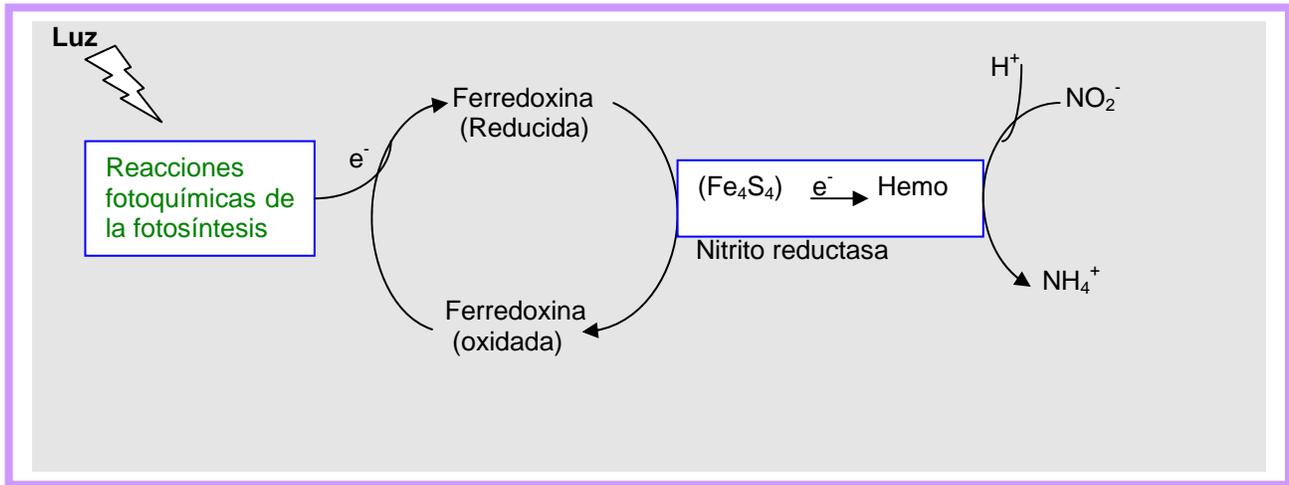
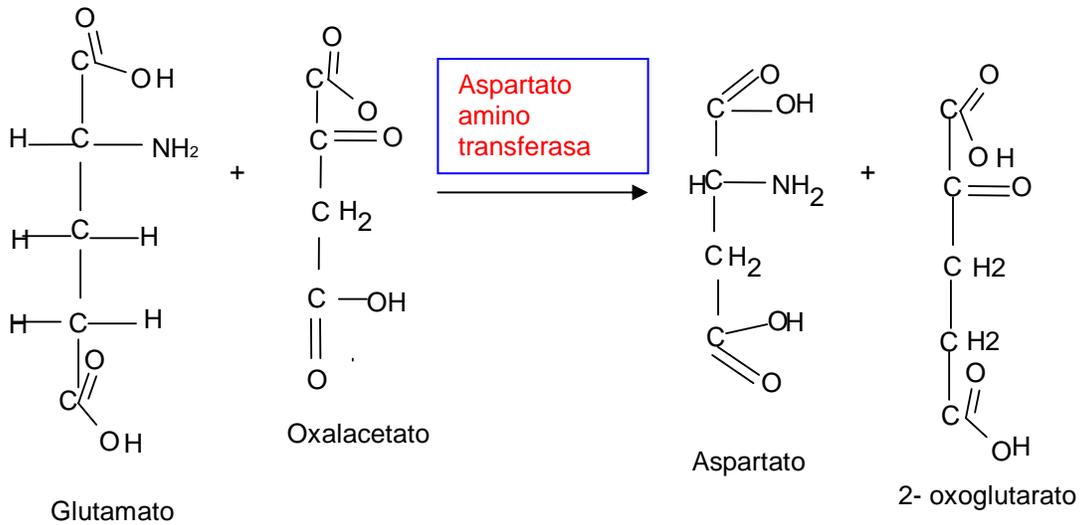
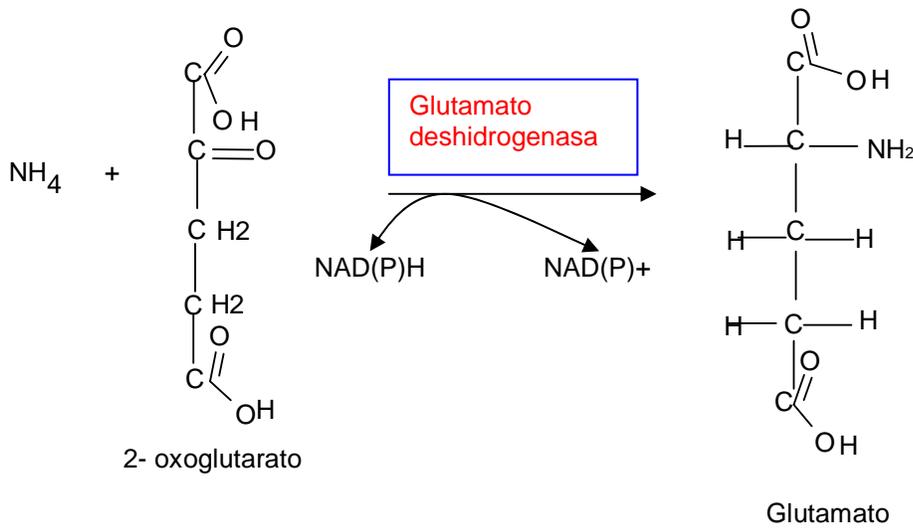
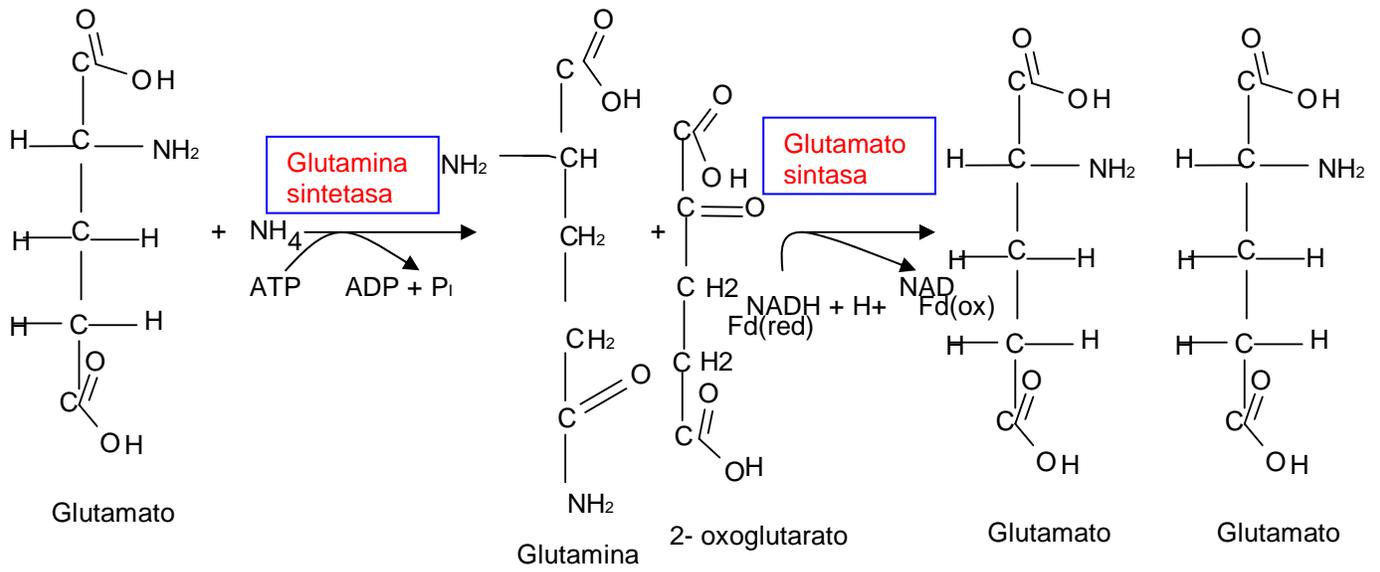


Figura 6. Modelo del acoplamiento del flujo de electrones fotosintéticos, vía ferredoxina, a la reducción del nitrito por la nitrito reductasa (Taiz and Zeiger, 1998).

Relación entre la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno

El hecho de que los aminoácidos estén constituidos por esqueletos carbonados y nitrógeno pone en evidencia la relación entre la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno. Esta relación no sólo está dada por el requerimiento de esqueletos carbonados sintetizados por fotosíntesis para la incorporación del amonio, sino también debido a la dependencia de algunas reacciones del metabolismo del nitrógeno de ATP y NADPH, producido en la fotosíntesis (Figura 9). Por otra parte, en los tejidos no fotosintéticos, los requerimientos energéticos son obtenidos por la degradación de los azúcares transportados desde las hojas.

A nivel de la regulación de la actividad y síntesis de las enzimas del metabolismo del carbono y del nitrógeno, se pone en evidencia la relación entre ambos procesos. La luz afecta la fotosíntesis pero también controla la expresión de la nitrato y nitrito reductasa y la sacarosa fosfato sintetasa (SPS), enzima responsable de la síntesis de sacarosa (Huber *et al.* 1992; Li and oaks, 1993). La acumulación de los productos finales de la fotosíntesis aumenta la actividad de la NR (Huber *et al.*, 1992). Por otra parte, la SPS responde a la disponibilidad de nitrato (Kaiser and Huber, 1994). En consecuencia, existe un rápido ajuste del ritmo de reducción del nitrato a fluctuaciones en la disponibilidad de carbohidratos, regulando en definitiva, los flujos del carbono y nitrógeno en las células vegetales (Kaiser and Huber, 1994).



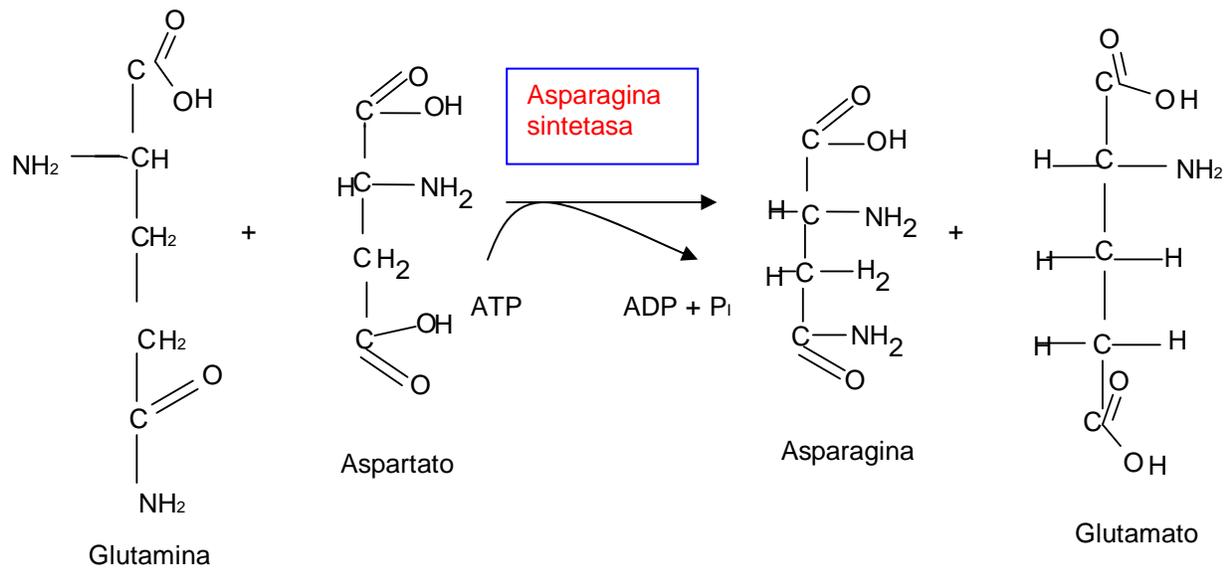


Figura 8. Estructura y reacciones de los compuestos involucrados en el metabolismo del amonio (Taiz and Zeiger, 1998)

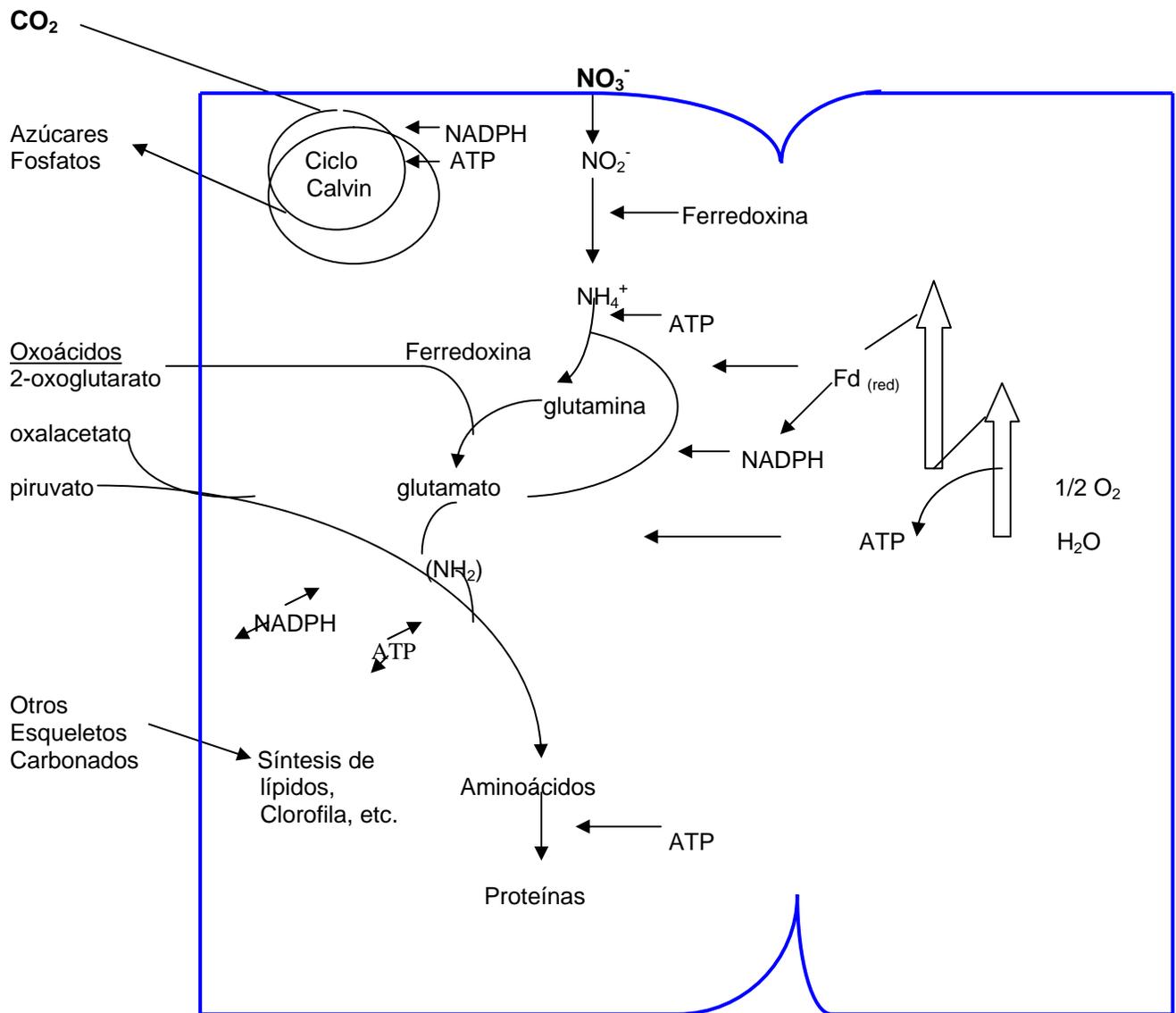


Figura 9. Asimilación del nitrógeno en el cloroplasto, mostrando la interacción de los productos de la etapa fotoquímica (ATP y NADPH) y la etapa bioquímica (esqueletos carbonados) con el metabolismo del nitrógeno (Lea and Leegood, 1993).

Bibliografía

Campbell, W.H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 277-303.

Cooper, H.D. and Clarkson, D.T. 1989. Cycling amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals. A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal Experimental botany*, 40, 753-762.

Henriksen, G.H. and Spanswick, R.M. 1993. Investigation of the apparent induction of nitrate uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) using NO₃⁻ - selective microelectrodes. *Plant Physiol.* 103: 885-892.

Huber, S.C.; Huber, J.L.; Campbell, W.H. and Redinbaugh, M.G. 1992. Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose -phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiol.* 100, 706-712.

Kaiser, W.M. and Huber, S. 1994. Modulation of nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg²⁺ and 5' AMP. *Planta* 193, 358-364.

Lea, P.J. and Leegood R.C. 1993. *Plant biochemistry and molecular biology*. Wiley & Sons. 297 pp.

Li, X.Z. and Oaks, A. 1993. Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. *Plant physiology*, 102, 1251-1257.

Miller, A.J. and Smith, S.J. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal Experimental Botany* 47, 843-854.

Morot-Gaudry, J.F. *Assimilation de l' azote chez les plantes*. 1997. INRA editions. Pp. 418.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Segunda Edición. Sinauer Associates, Inc., Publishers. pp. 792.

Vidmar, J.J.; Zhuo, D.; Siddiqui, M.Y.; Schjoerring, J.K.; Touraine, B. And Glass, A.D.M. 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol.* 123, 307-318.

