Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Absorção e Metabolismo de Nitrogênio em Plantas

Sonia Regina de Souza
Profª.Associada IV-Bioquímica

Setembro/2014

Nitrogênio

- É um dos nutrientes requeridos em maiores quantidades

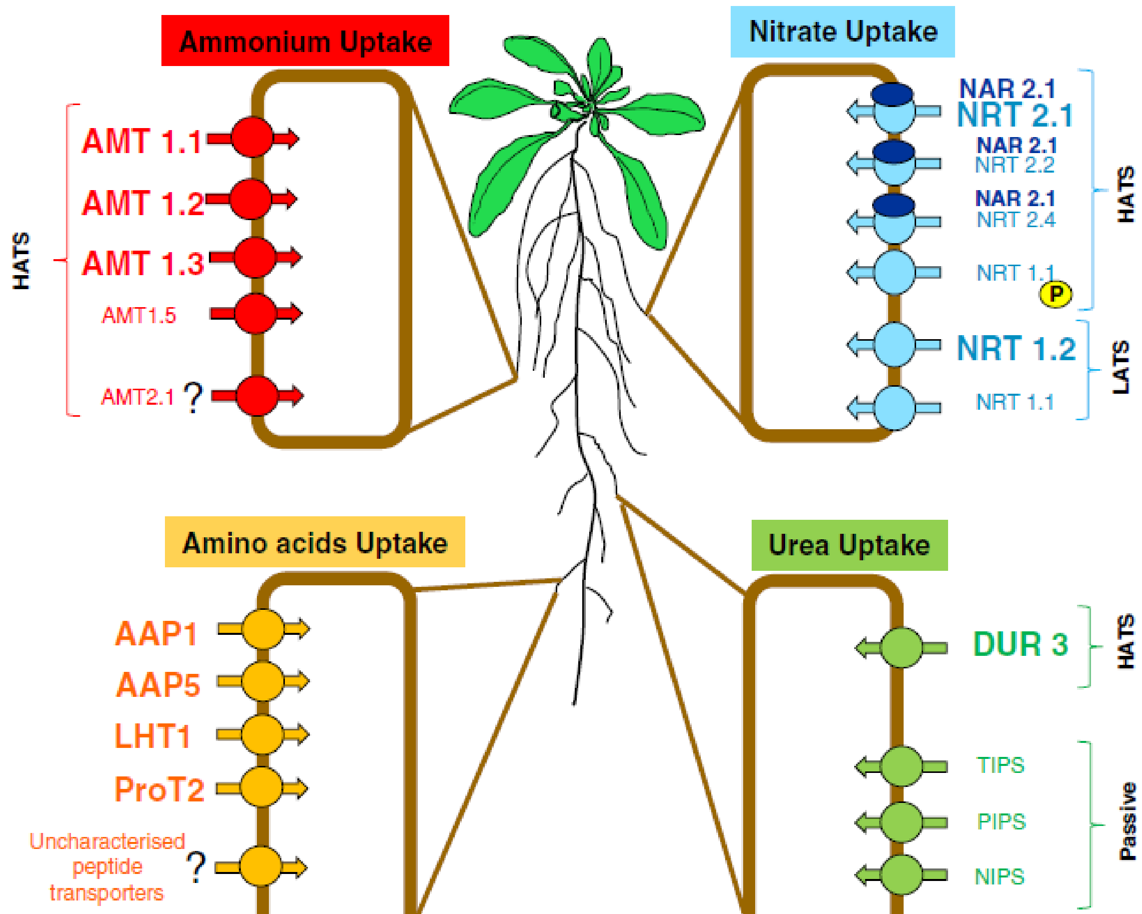
Disponibilidade no solo ↓

Aplicação de N ↑

- Até 70% do N aplicado = perdido

"Eficiência de Absorção e Uso de N pelas Plantas"

N absorvido: orgânica ou inorgânica



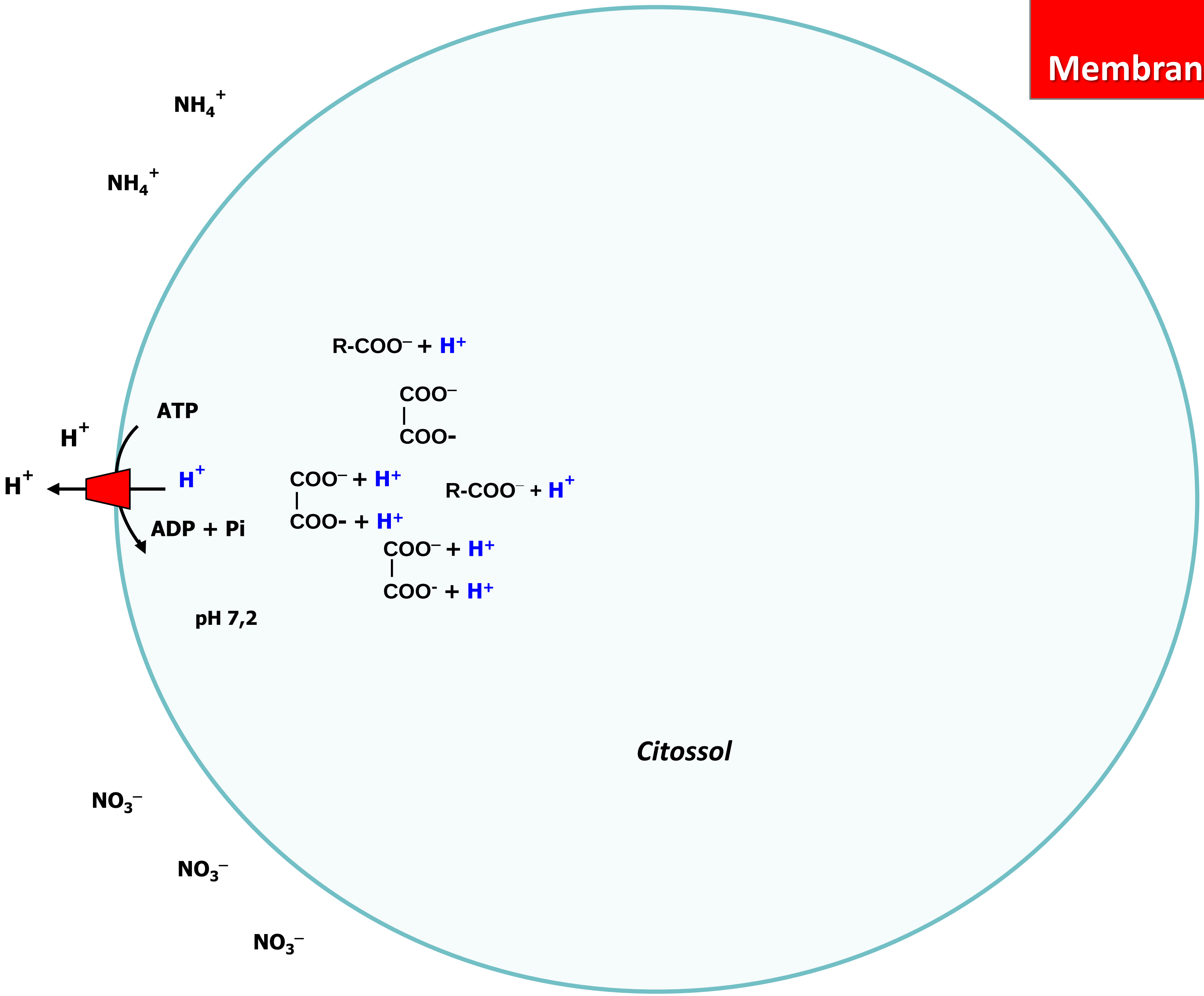
Principais formas absorvidas:
NH_4^+ e NO_3^-

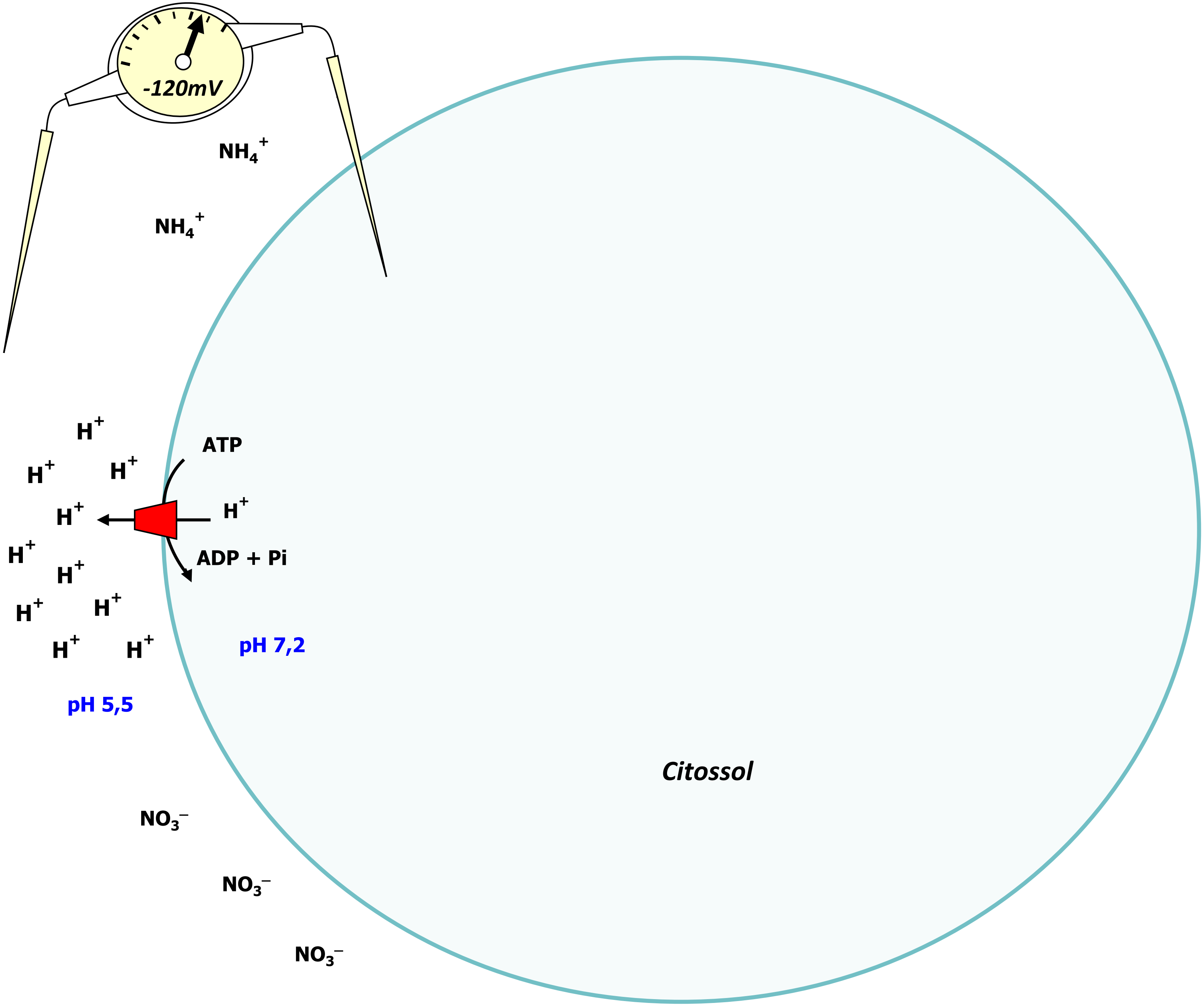
Peptídeos
Aminoácidos
Uréia

Nacry et al., 2013

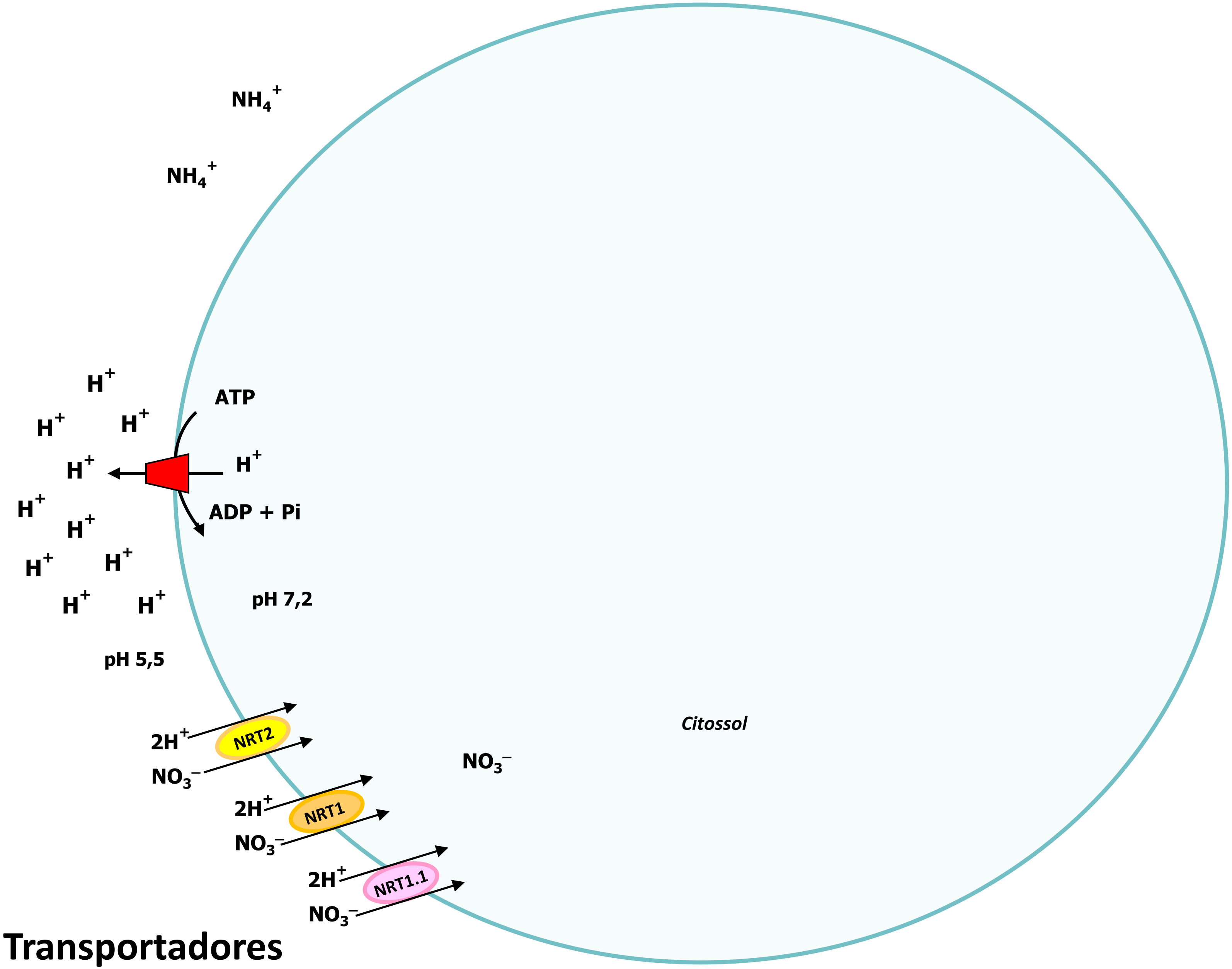
Absorção

P-H⁺-ATPases de Membrana plasmática



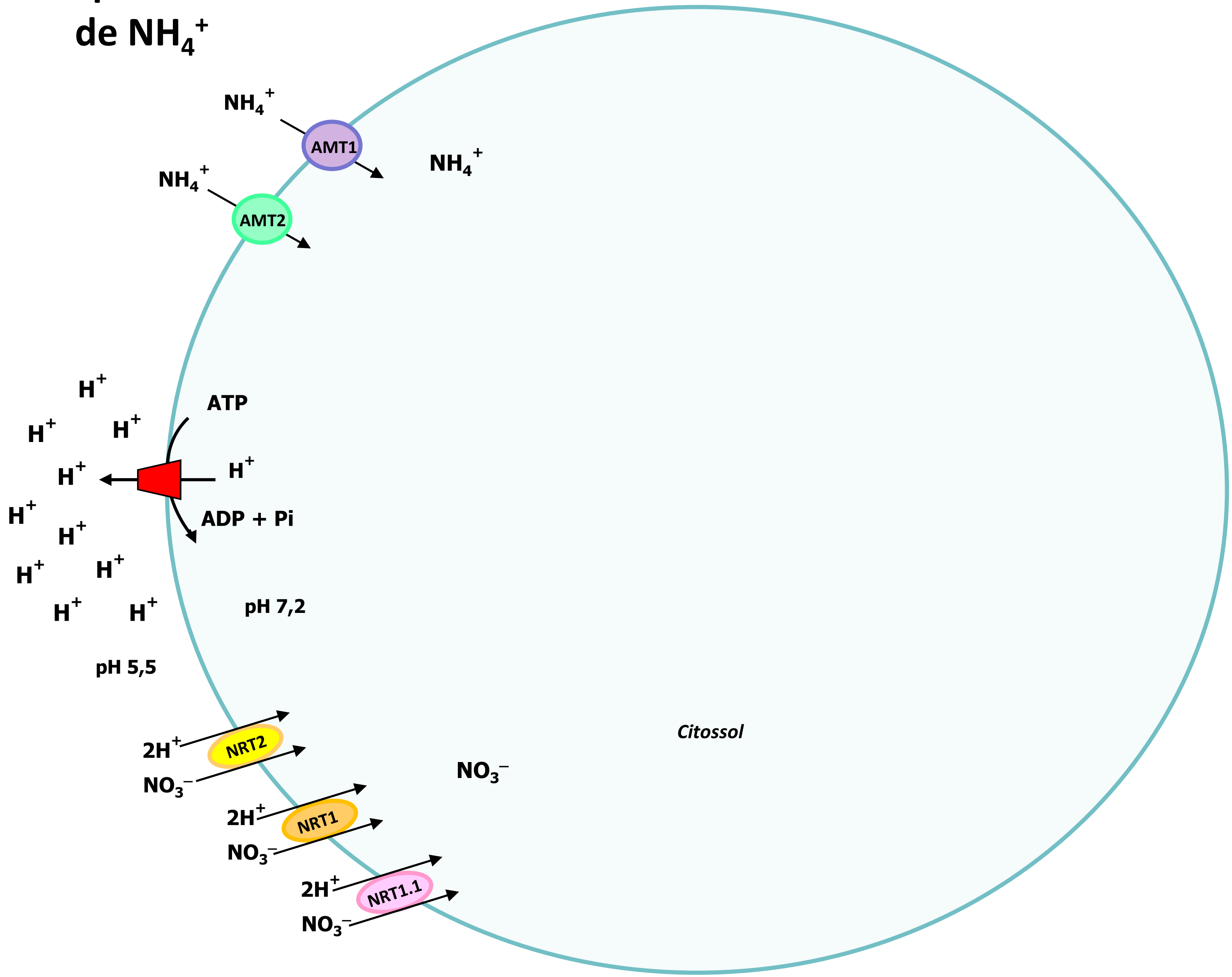


-120mV
NH_4^+
NH_4^+
H^+
H^+
H^+
ATP
H^+
H^+
H^+
ADP + Pi
H^+
H^+
H^+
H^+
H^+
pH 7,2
pH 5,5
Citossol
NO_3^-
NO_3^-
NO_3^-



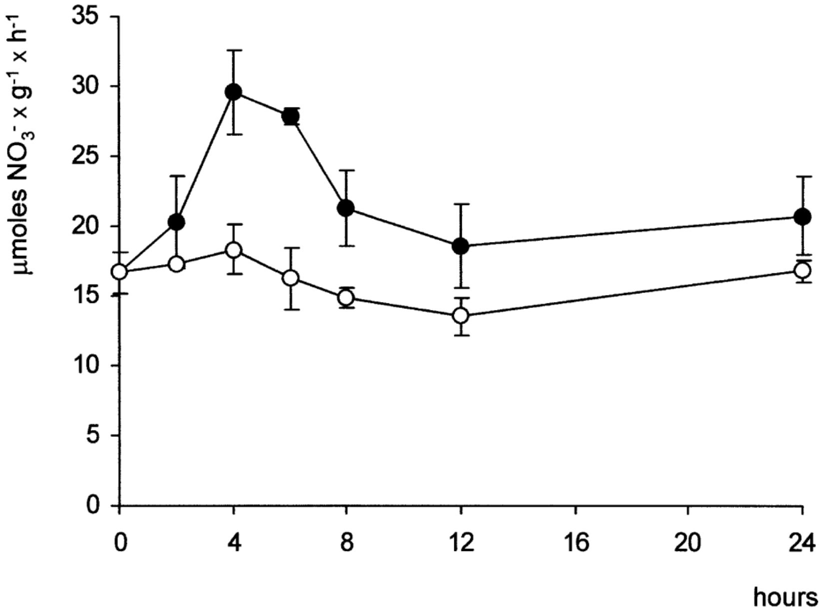
Transportadores de NO_3^-

Transportadores de NH_4^+

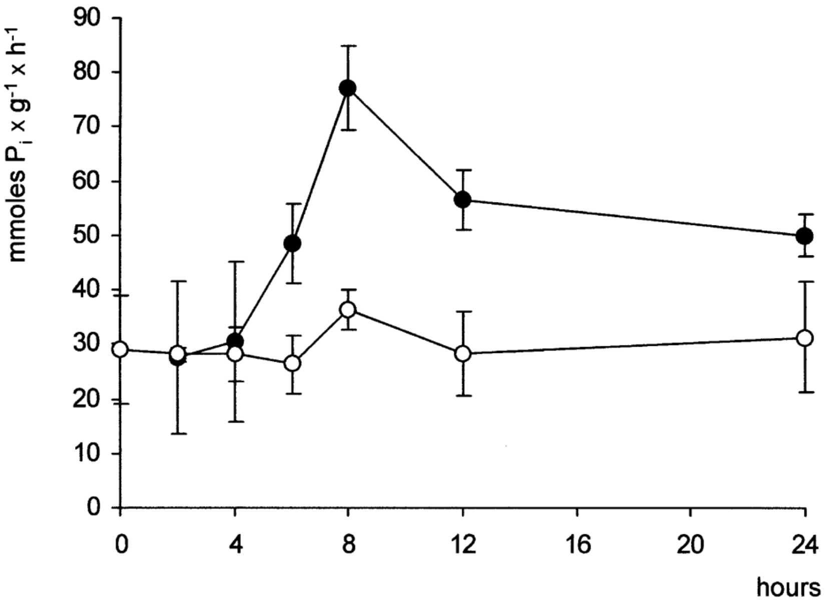


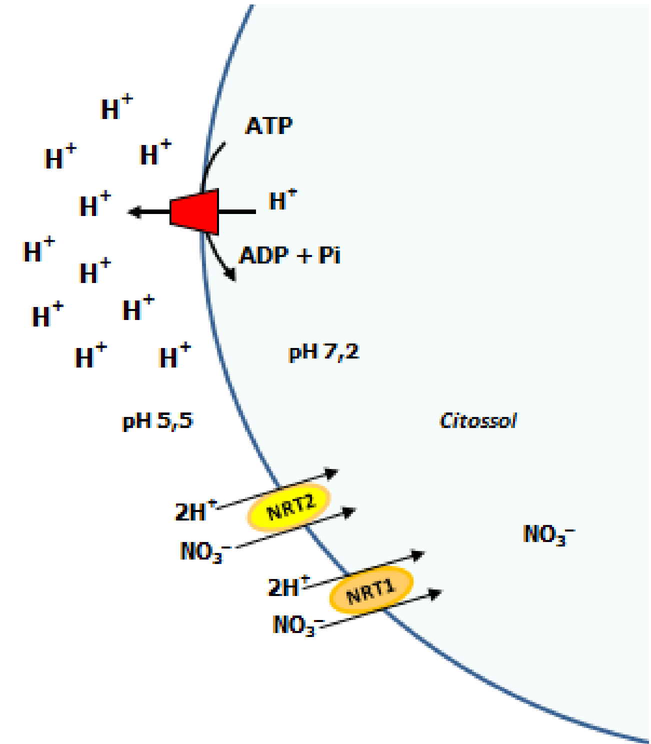
Absorção de NO_3^- x Atividade de P-H^+-ATPase

Absorção de NO_3^-



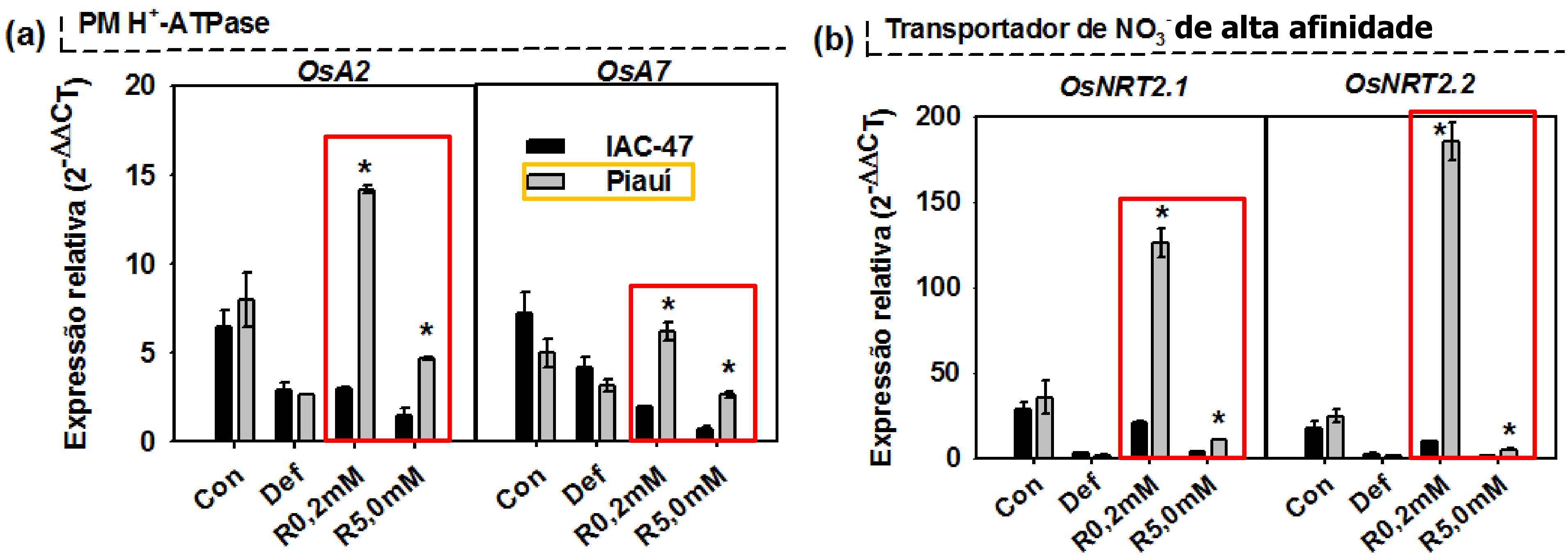
Atividade das P-H^+-ATPAse





Santi et al. (2003)

Expressão gênica de isoformas de P-H^+-ATPases (*OsA2 e OsA7*)
x
NRT2.1 e NRT2.2 em arroz



*$P<0{,}05$

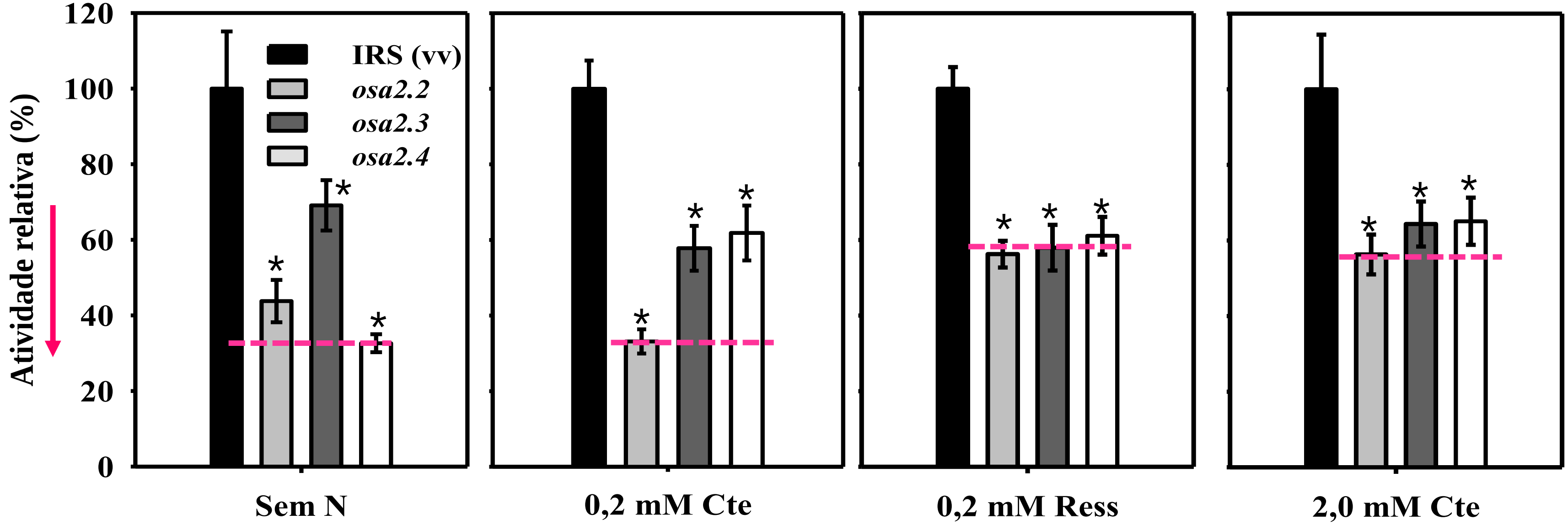
Maior expressão em baixa dose de NO_3^-

Sperandio et al. (2014)

Silenciamento de P-H$^+$-ATPase *osa 7* por amiRNA

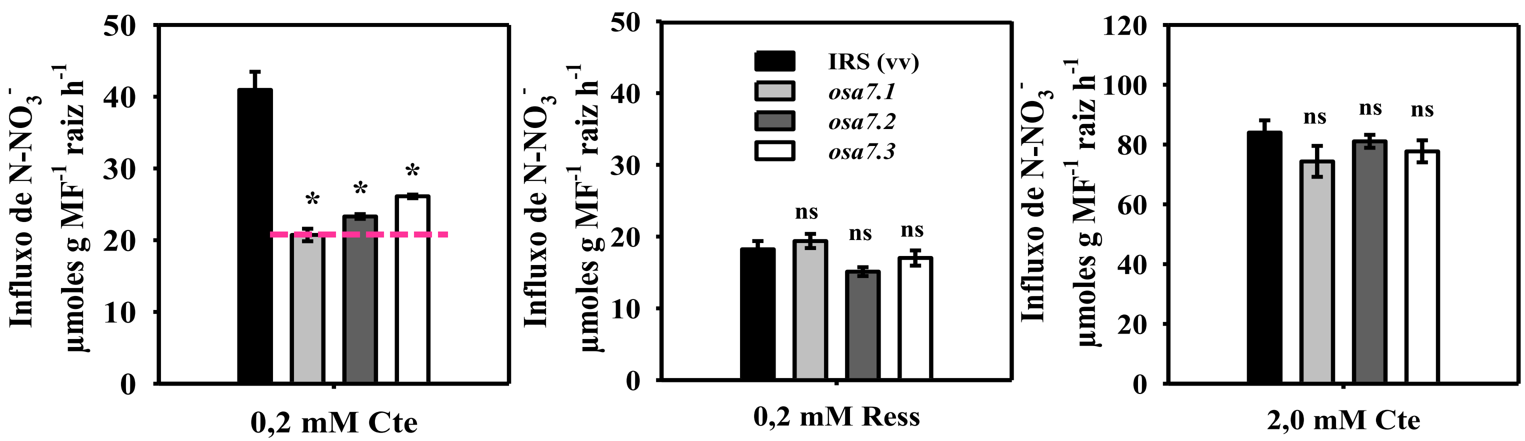
Atividade das P-H$^+$-ATPases e influxo de NO_3^- em mutantes de arroz *osa7*

Atividade da PM H$^+$-ATPase (µmol Pi mg^{-1} proteina h^{-1})



Experimento mutantes *osa7*

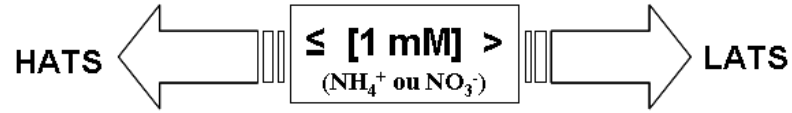
Influxo de NO_3^-

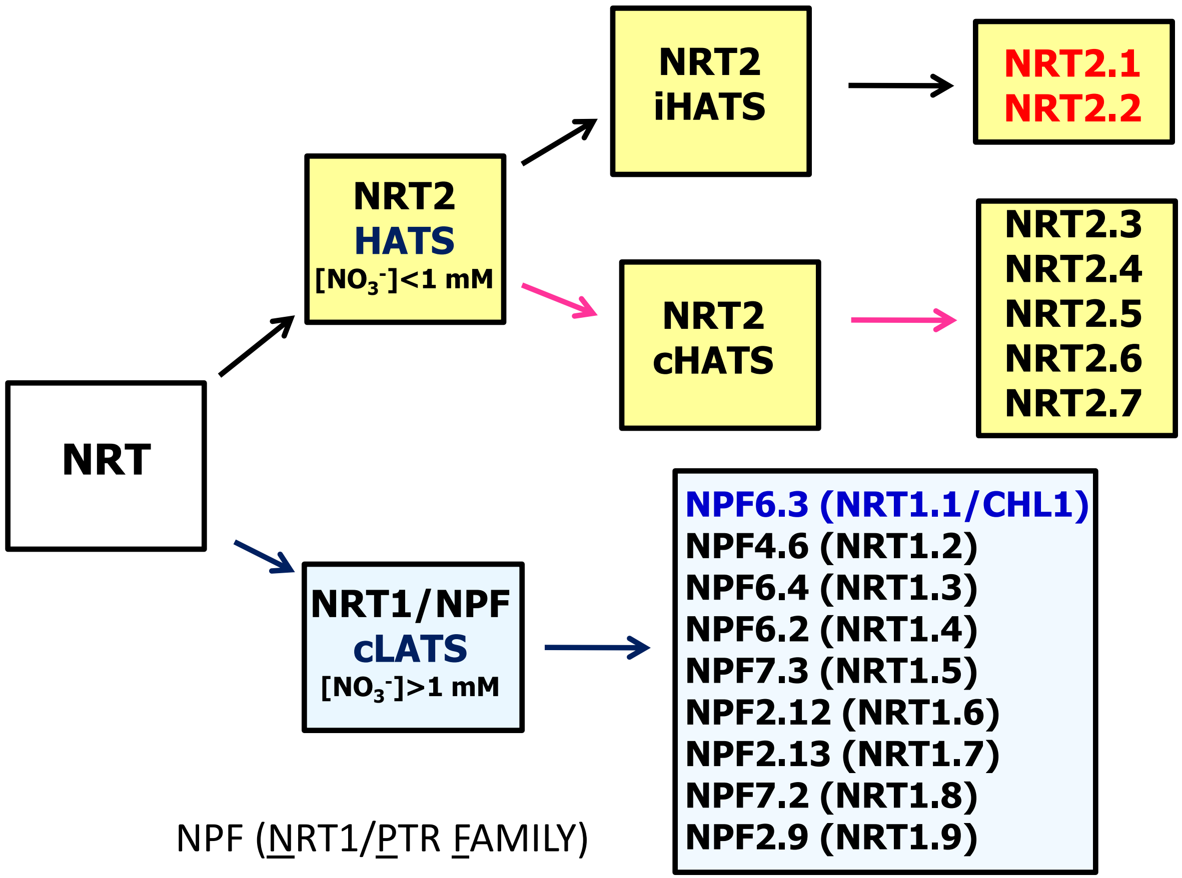


Sperandio MVL (em andamento)

Absorção de NO_3^-

Transportadores de NO_3^-

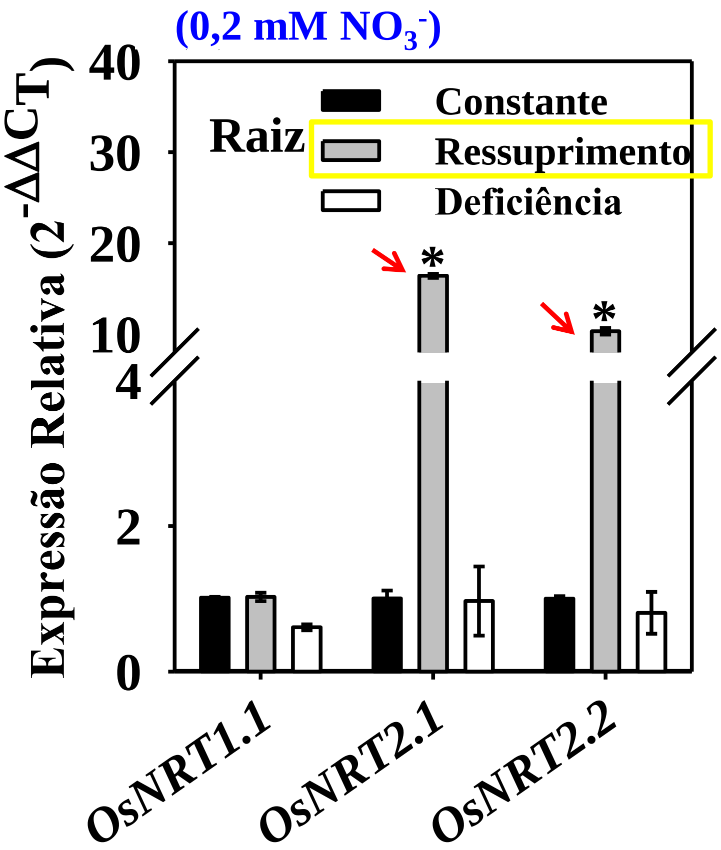




Transportadores de NO_3^- de alta afinidade:

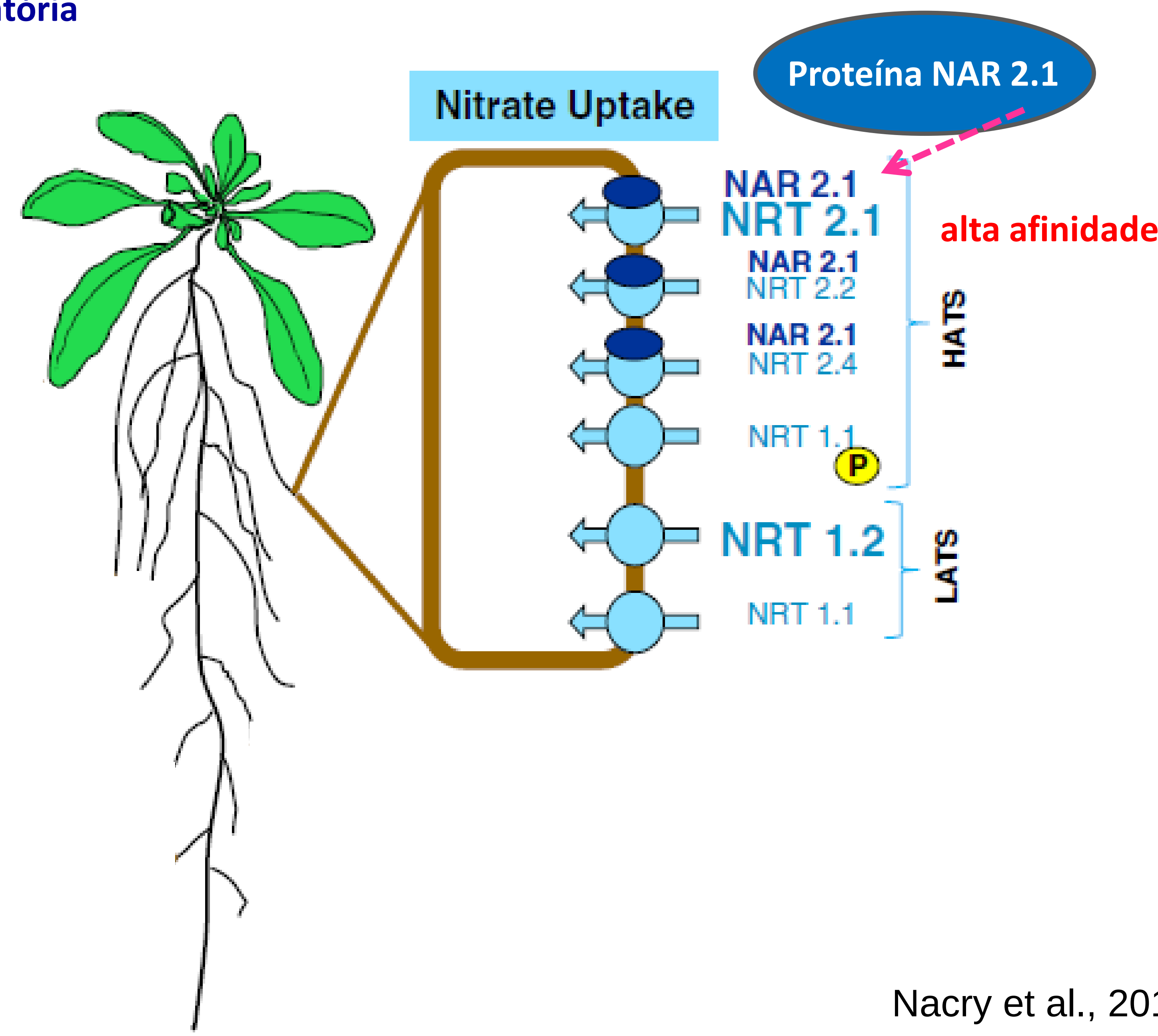
OsNRT2.1 e OsNRT2.2

> Expressão gênica em baixo N



(SPERANDIO et al., 2011)

Proteína Regulatória
NAR2.1
e
NRT2.1



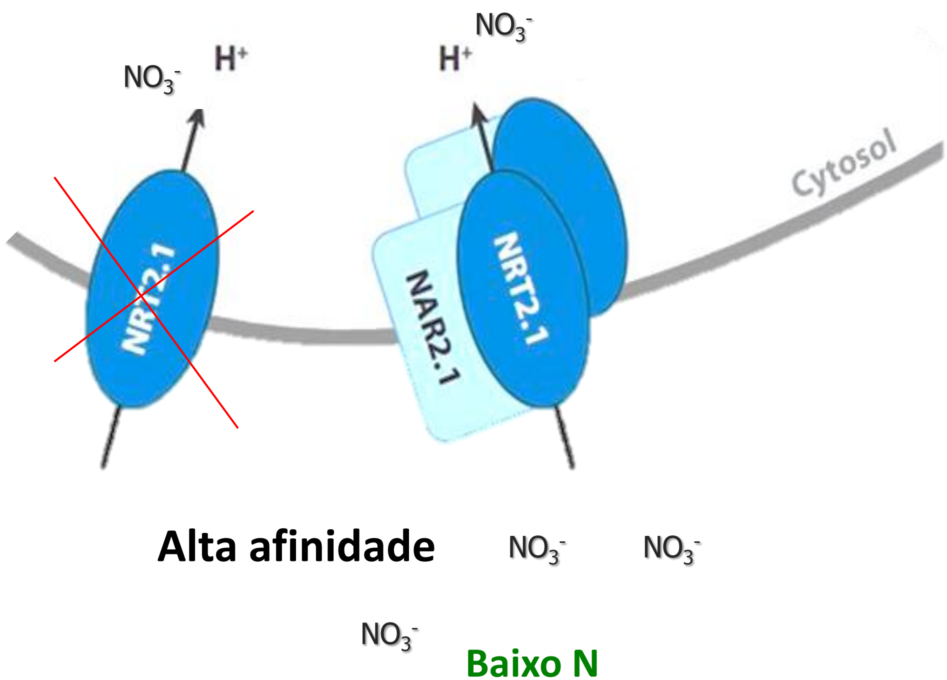
Nacry et al., 2013

Proteína Regulatória NAR2.1

e

NRT2.1

E a absorção sob baixo N

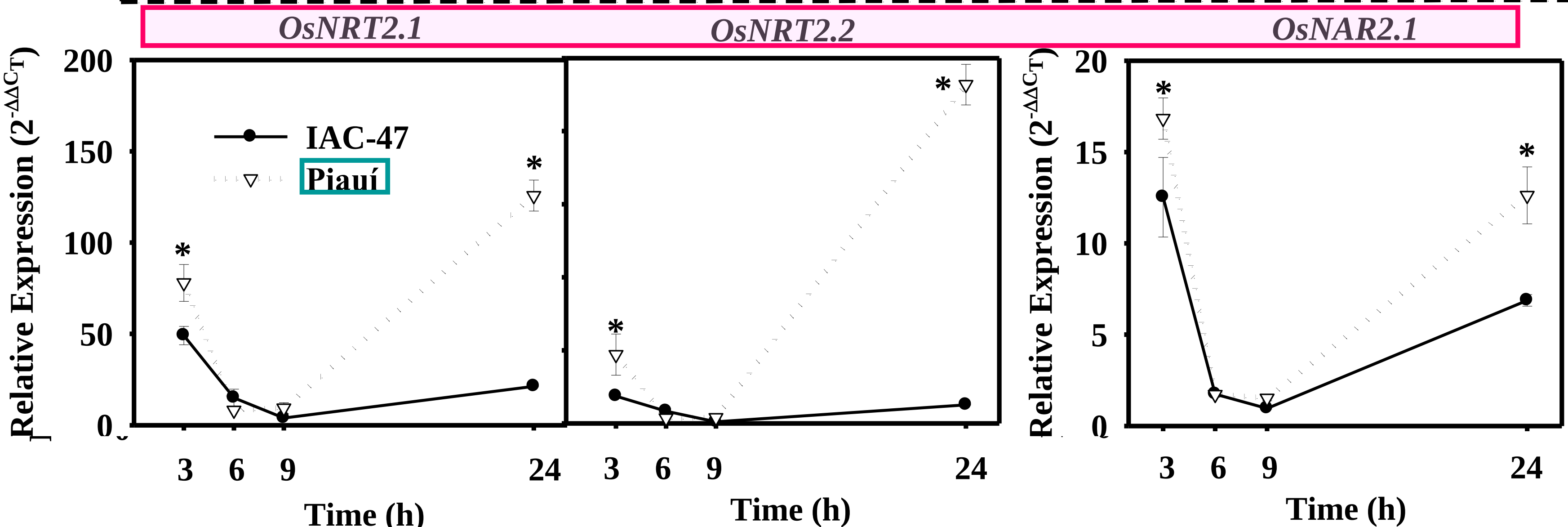


Alta afinidade

Barbier-Brygoo et al., 2011

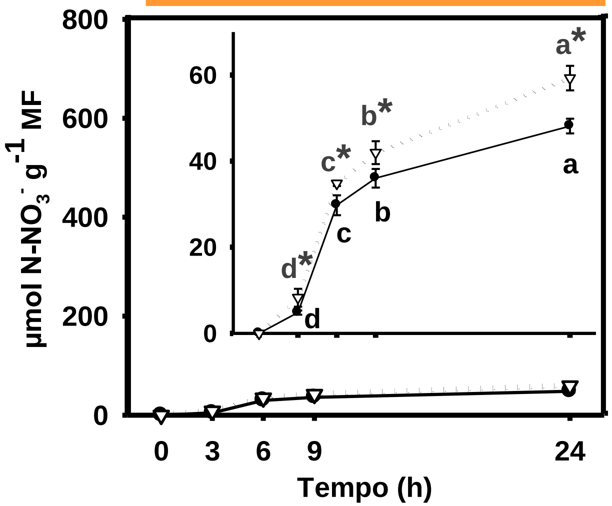
Expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* em variedades de arroz X Absorção de NO_3^-

0.2 mM NO_3^--N (resupply)



Teor de NO_3^- na planta

0,2 mM N-NO_3^- (ressuprimento)



OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* X *OsNAR2.1

		IAC-47 variety
Genes	*OsNRT2.1*	*OsNRT2.2*
OsNRT2.2	0.9423**	
OsNAR2.1	0.9030**	0.8665**
Piauí variety		
OsNRT2.2	0.9385**	
OsNAR2.1	0.9358**	0.8727**

** *P*< 0,01

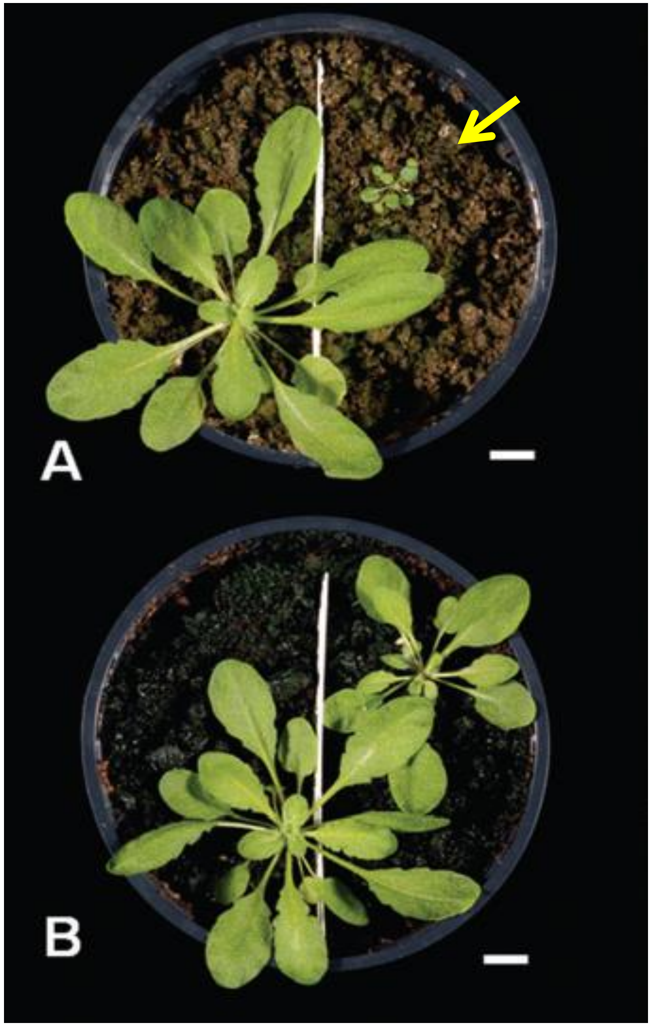
(Sperandio et al., 2014)

Silenciamento nar2.1 em Arabidopsis

Plantas WT

Plantas mutantes *nrt3.1*

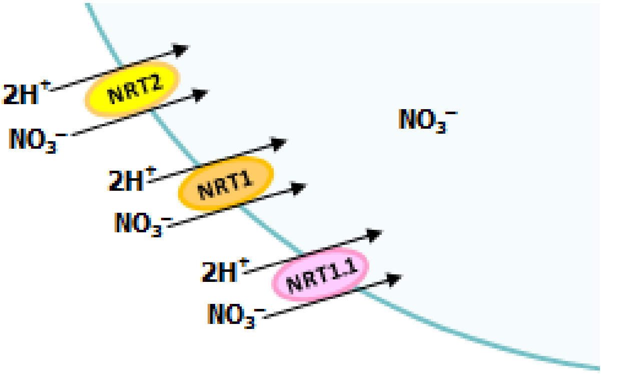
NRT3.1 ~ ao NAR2.1
Silenciadas nrt3.1



Baixo Suprimento de N-NO_3^-

Alto Suprimento de N-NO_3^-

(MILLER et al., 2007)



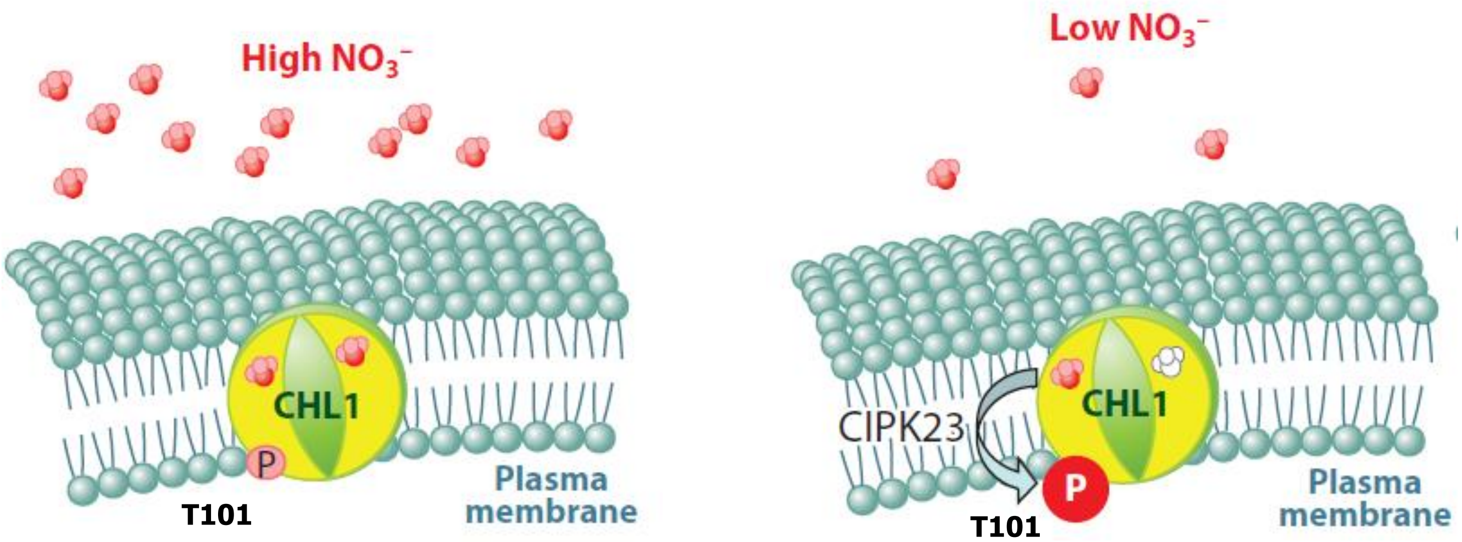
Transportador de nitrato de dupla afinidade
CHL1 (NRT1.1)

Arabidopsis: NPF6.3

Arroz: NPF8.9

NPF (NRT1/PTR FAMILY)

Transportador de nitrato de dupla afinidade
CHL1 (NRT1.1)

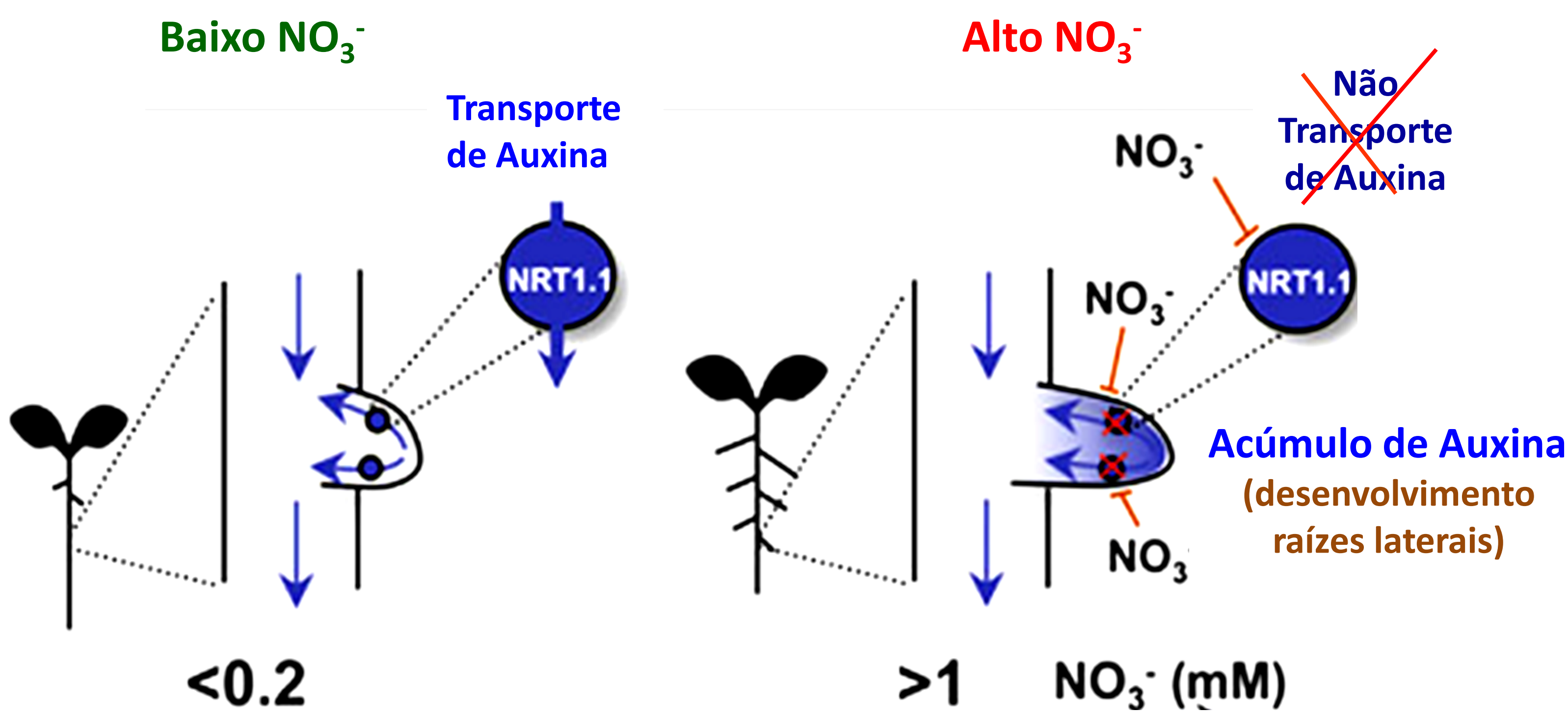


<u>Baixa afinidade</u> <u>Alta afinidade</u>

CIPK23 (calcineurin-like protein <u>C</u>BL-<u>I</u>nteracting <u>P</u>rotein <u>K</u>inase 23)

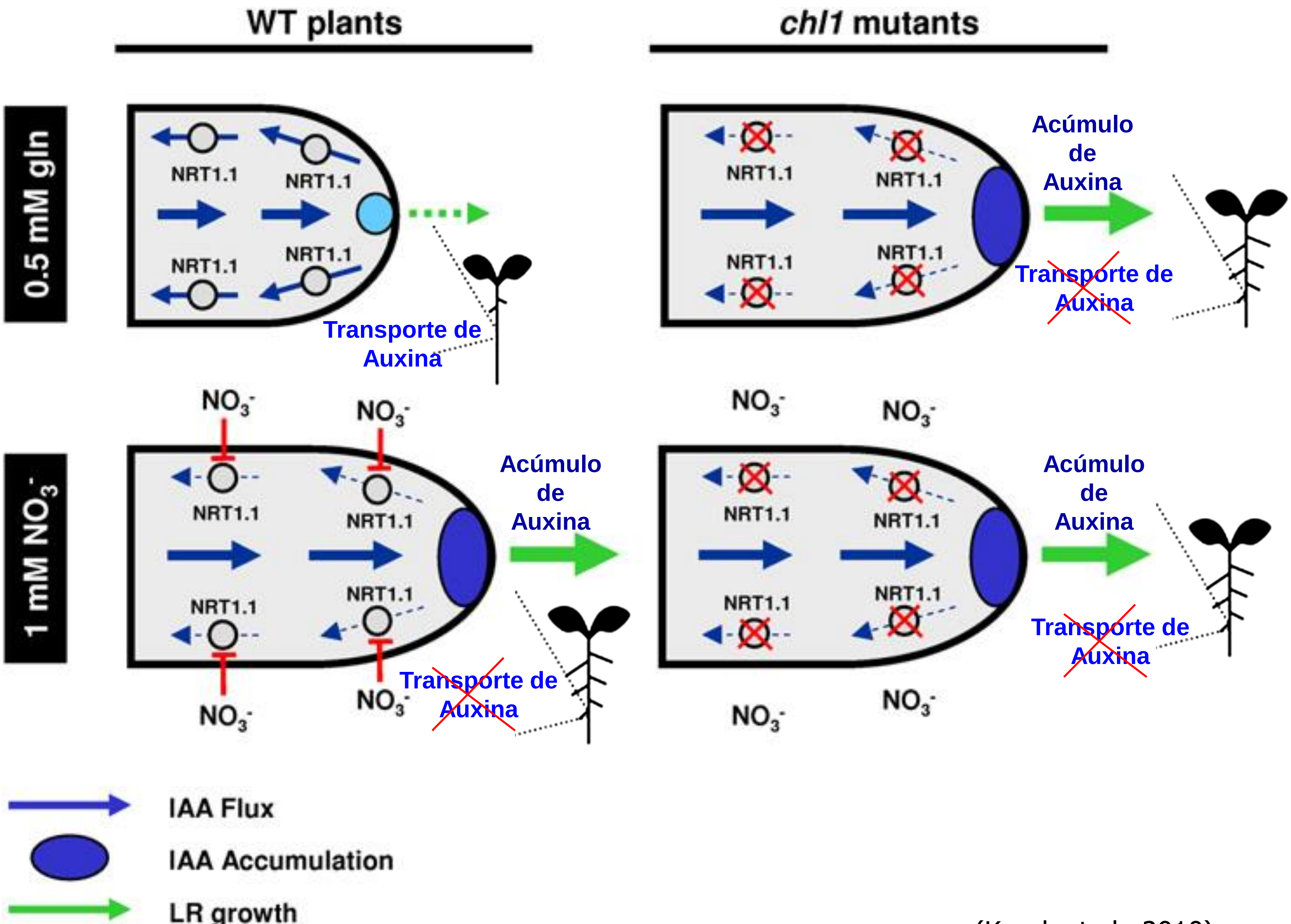
(Tsay et al., 2011)

O transceptor CHL1 (NRT1.1) e o desenvolvimento de raízes laterais em resposta ao NO_3^-



GOJON et al., 2011

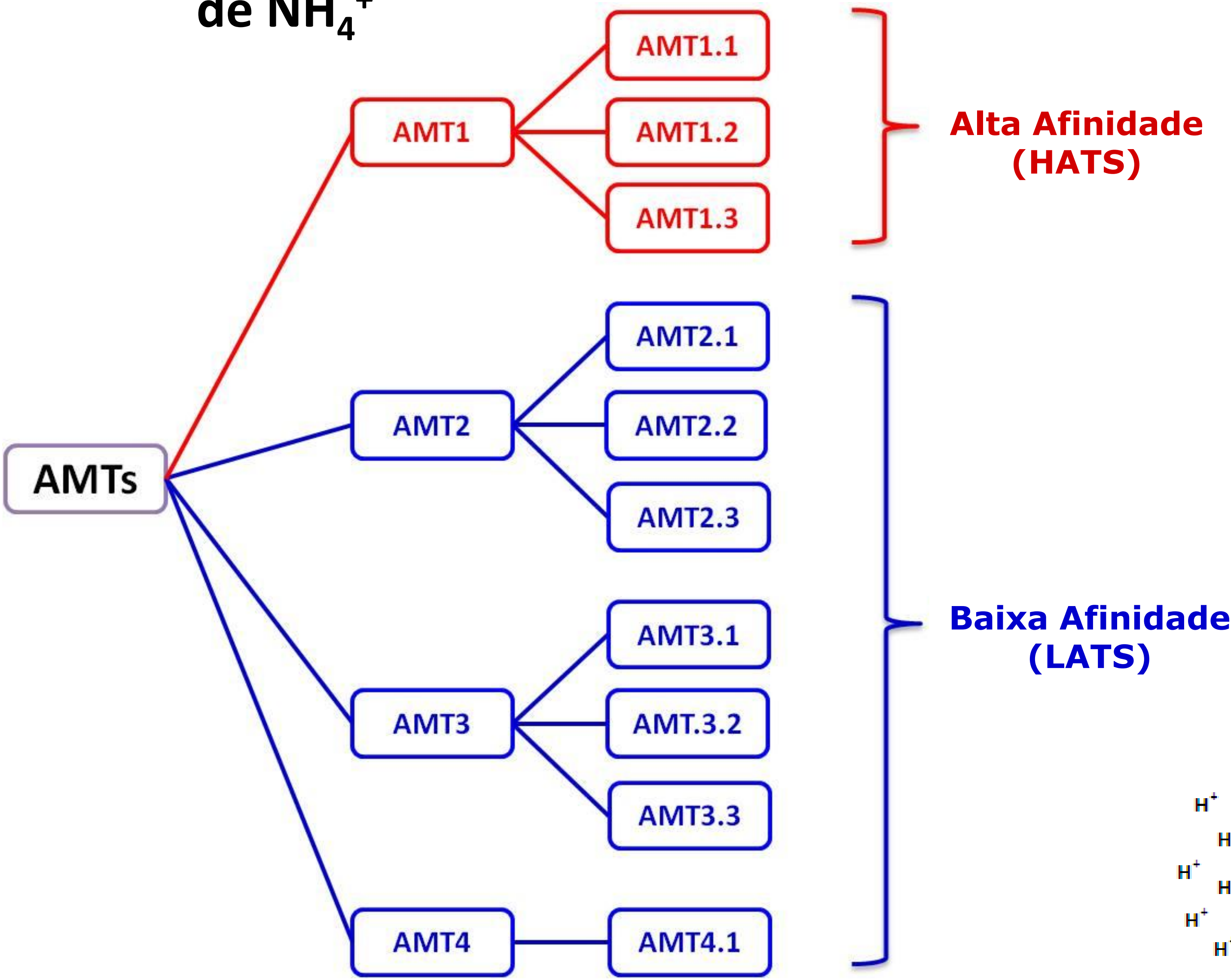
Silenciamento de *chl1*

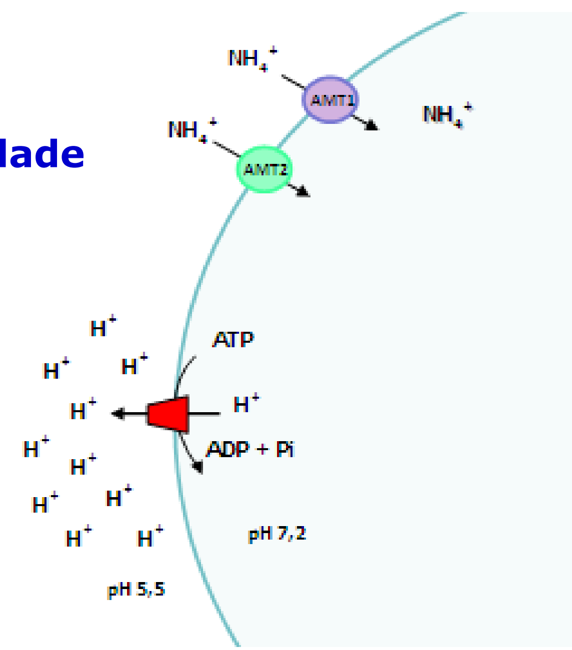


(Krouk et al., 2010)

Absorção de NH_4^+

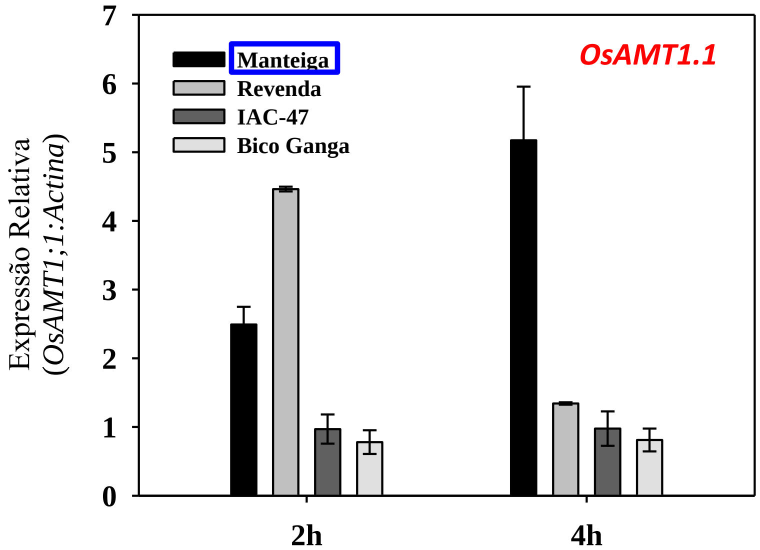
Transportadores de NH_4^+

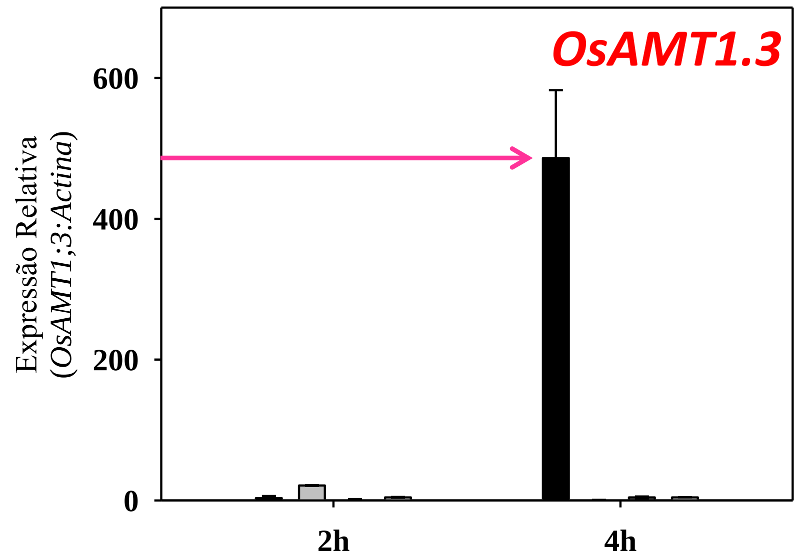


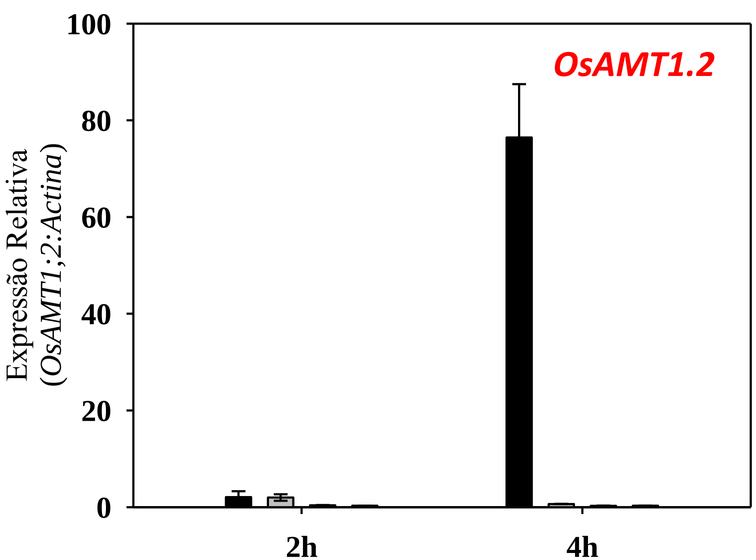


(AMT, Ammonium transporter)

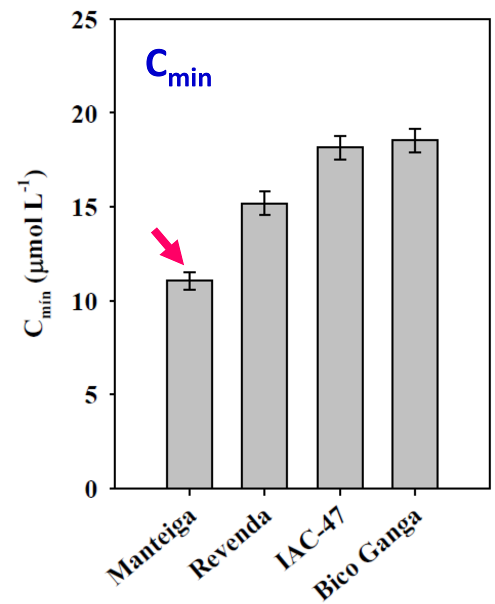
Variedade de arroz com maior eficiência de absorção sob baixo suprimento de NH_4^-.







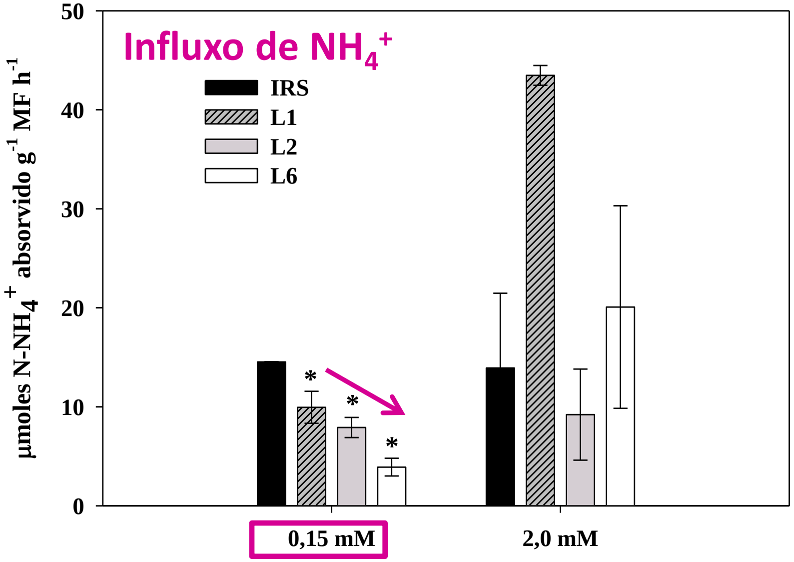
Manteiga:
proteína do grão > 12%

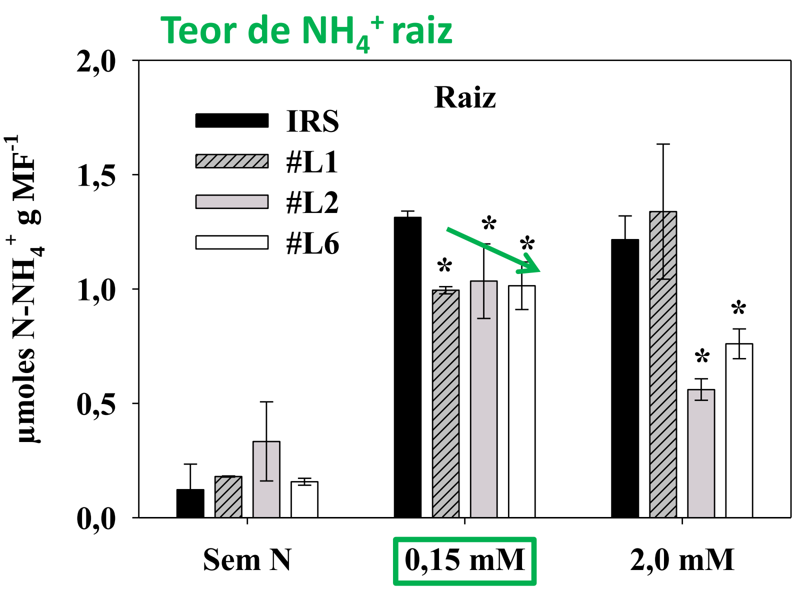


$C_{mín}$ para N-NH_4^+ em variedades de arroz. Valores obtidos 24 horas após a adição de solução com 0,2 mM de N-NH_4^+.

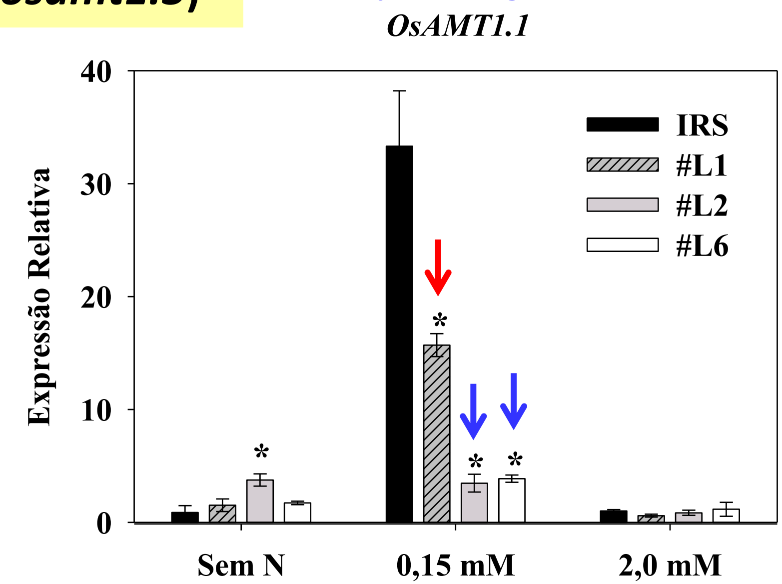
(Souza, VM. 2010)

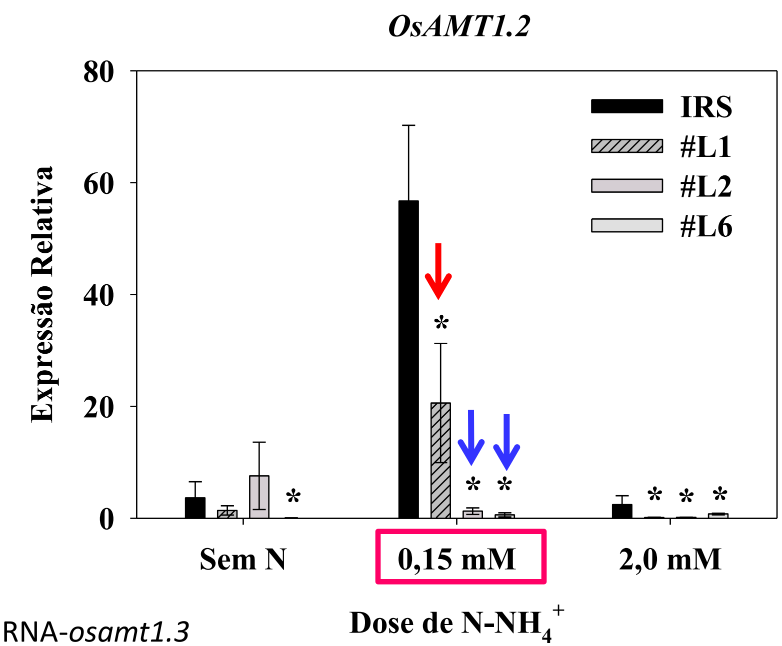
Silenciamento do *OsAMT1.3* por amiRNA em arroz (*osamt1.3*)





Expressão gênica





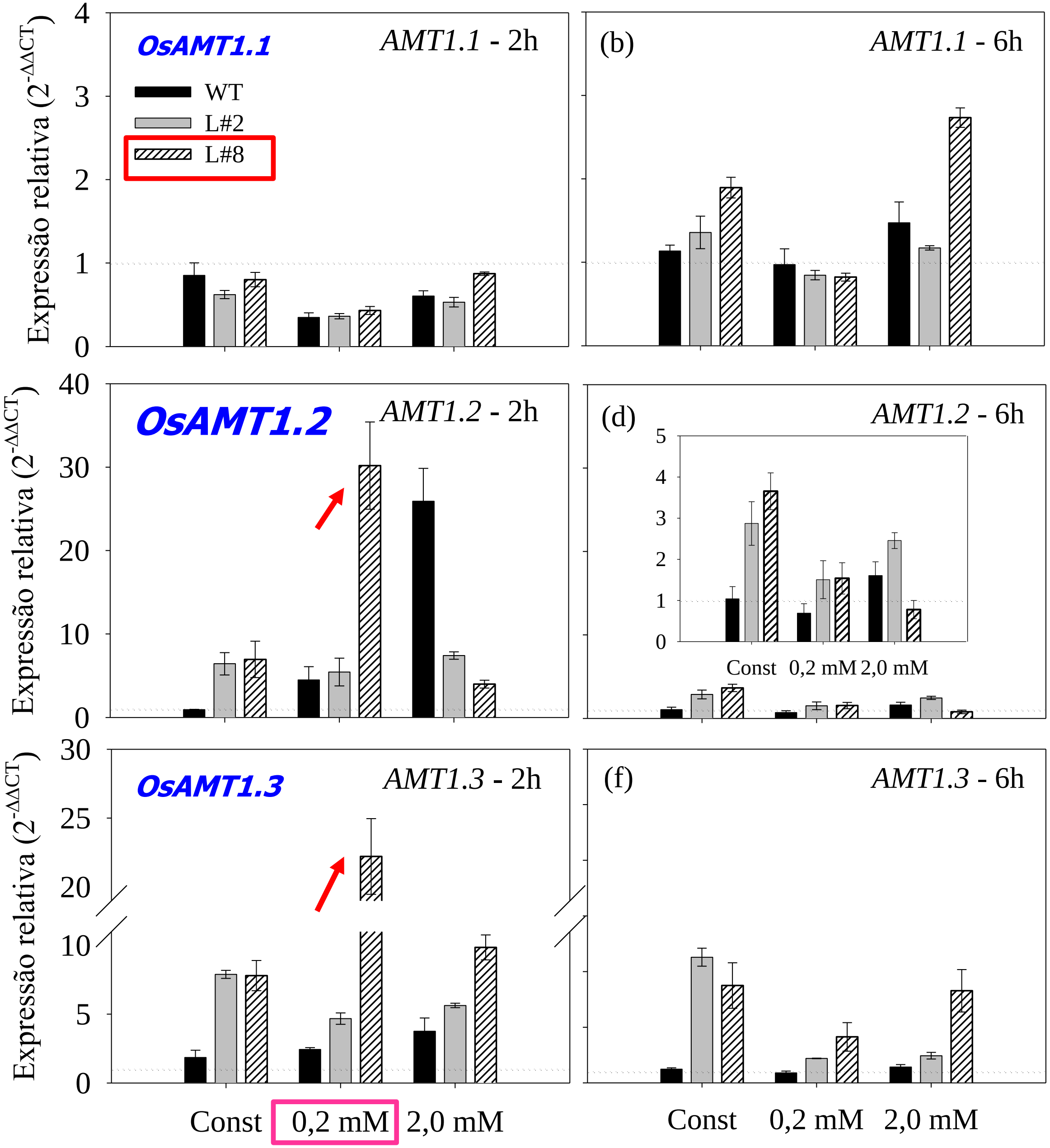
Linhagens mutantes L1, L2 e L6: amiRNA-*osamt1.3*

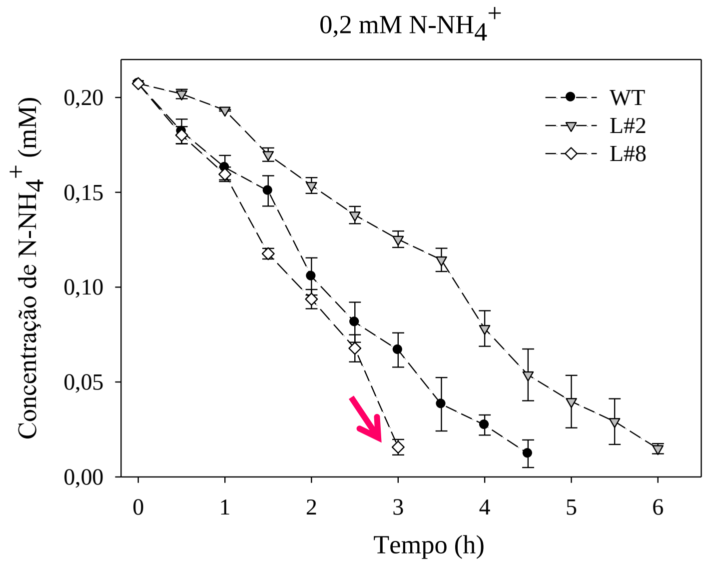
Influxo de NH_4^+ e teor do íon nas raízes de linhagens mutantes L1, L2 e L6 silenciando o gene *OsAMT1.3* (UBIL:amiRNA-*osamt1.3*) e plantas controle IRS154 (vetor vazio) ressupridas com 0,15 mM de N-NH_4^+ e supridas com 2,0 mM de N-NH_4^+.

Jacques, ML. 2014

Superexpressão do Os*AMT1.3 em arroz*

Expressão de AMT1





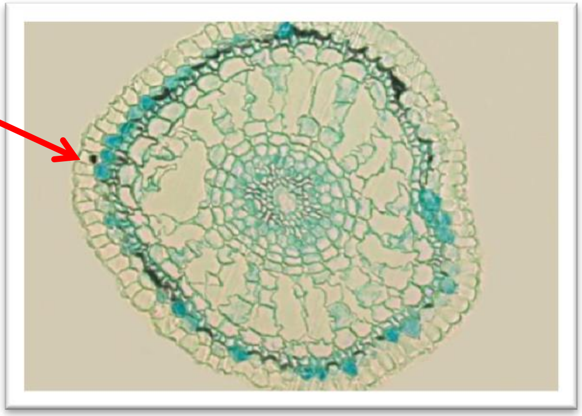
Linhagem 8 apresentou maior depleção de NH_4+ na solução nutritiva

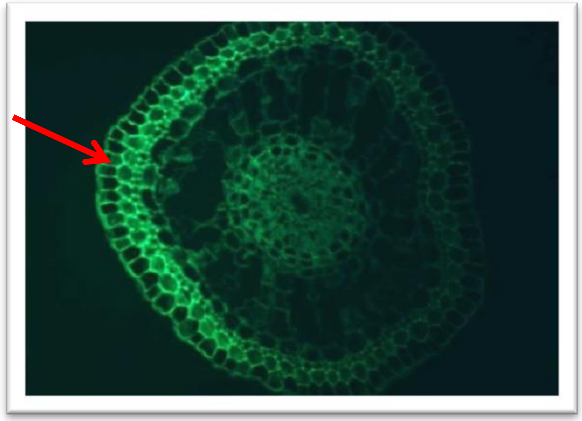
E maior expressão em baixa dose

(Ferreira, L. 2012)

Localização Tecido – específica do transportador de amônio *OsAMT1.3*

Corte transversal evidenciando alta atividade do *pOsAMT1.3* **região do córtex**



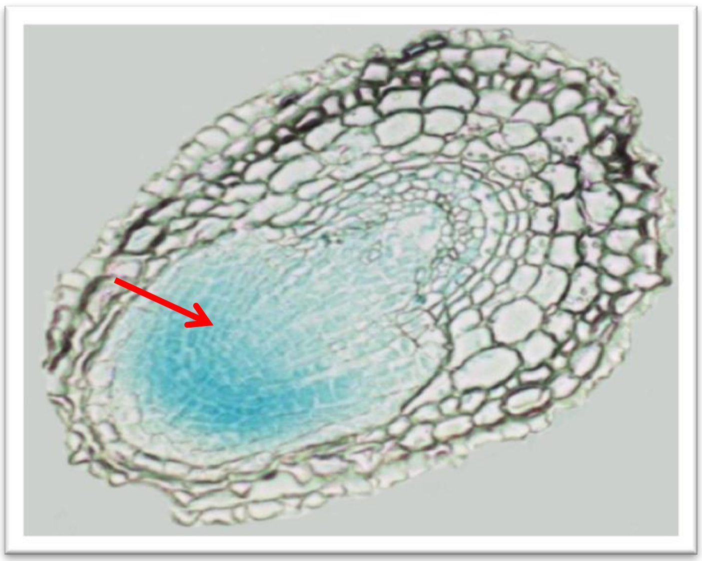


$P_{OsAMT1.3}$:GFP:GUS

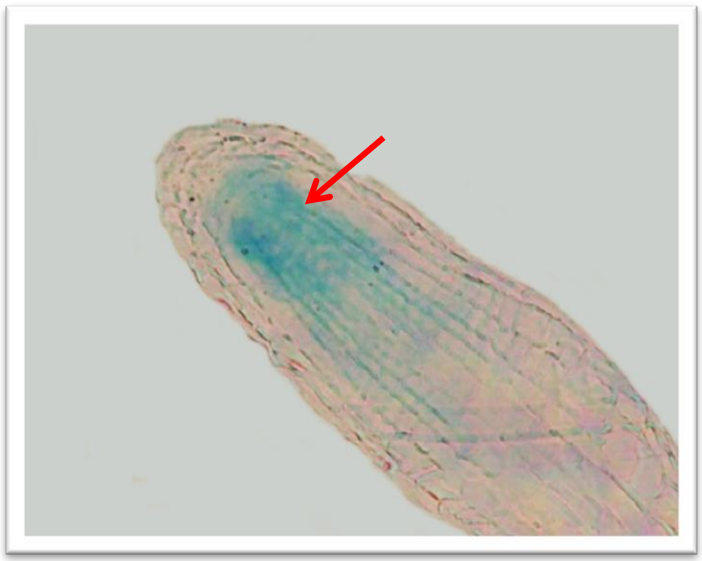
GUS – Azul
GFP – Verde

Locais de atuação do *OsAMT1.3* em plantas privadas de N.

- **Absorção**
- **Emissão raízes**



Corte transversal evidenciando a alta atividade do *pOsAMT1.3* na **região de emissão de raízes laterais** de plantas de arroz.

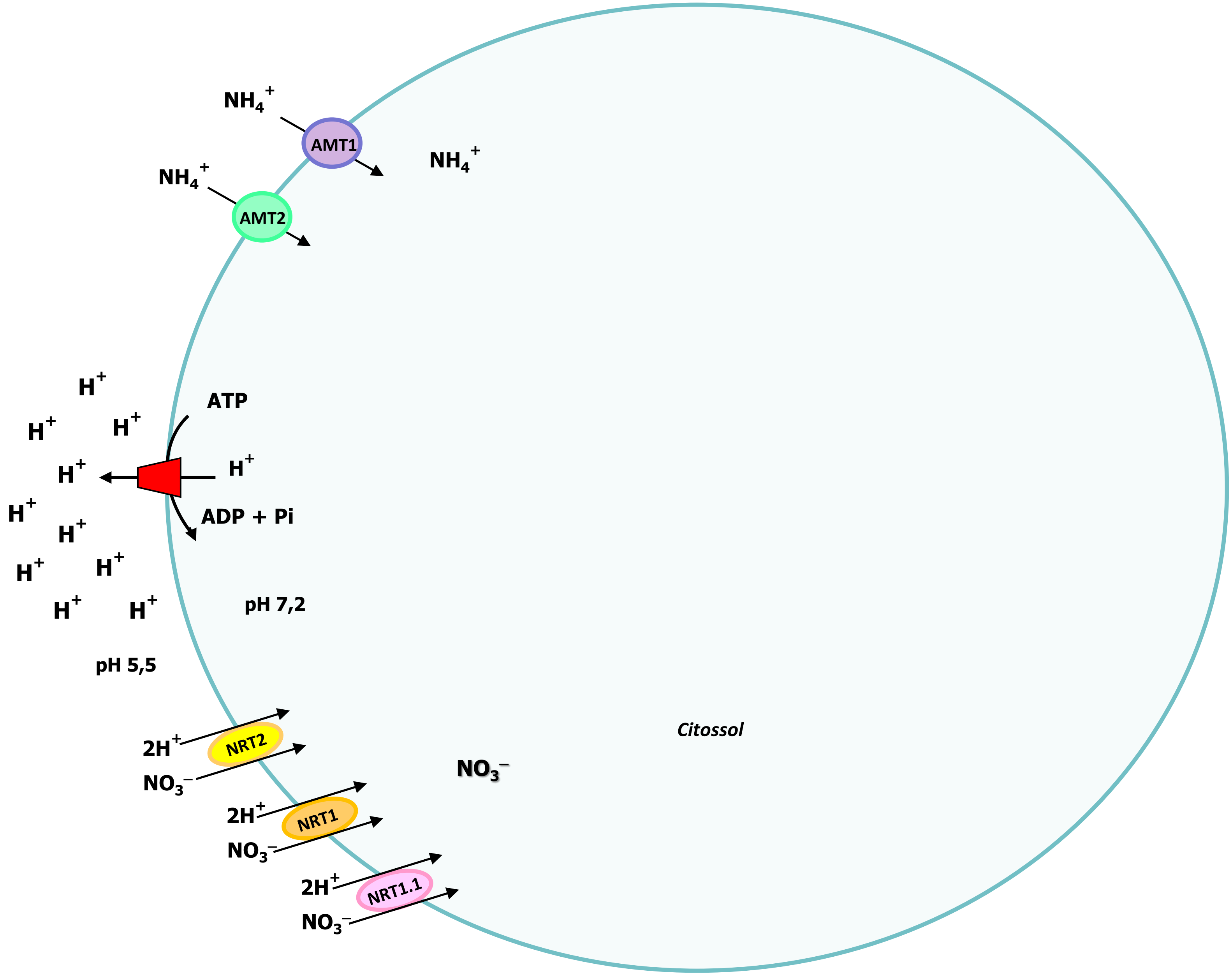


Corte longitudinal com detalhe para a **ponta da raiz lateral** com alta atividade do *pOsAMT1.3*.

(Ferreira, L. 2012)

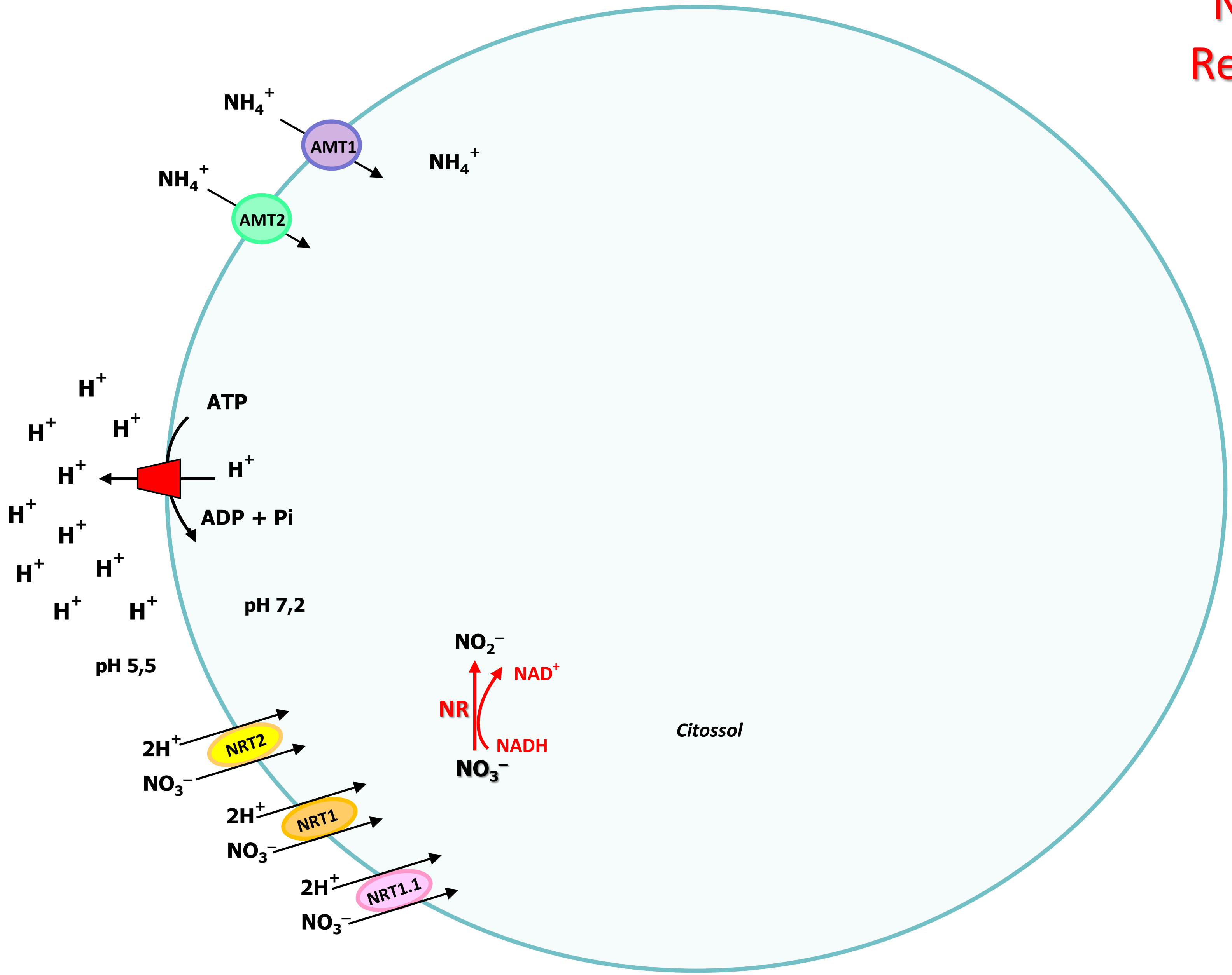
Redução do Nitrato

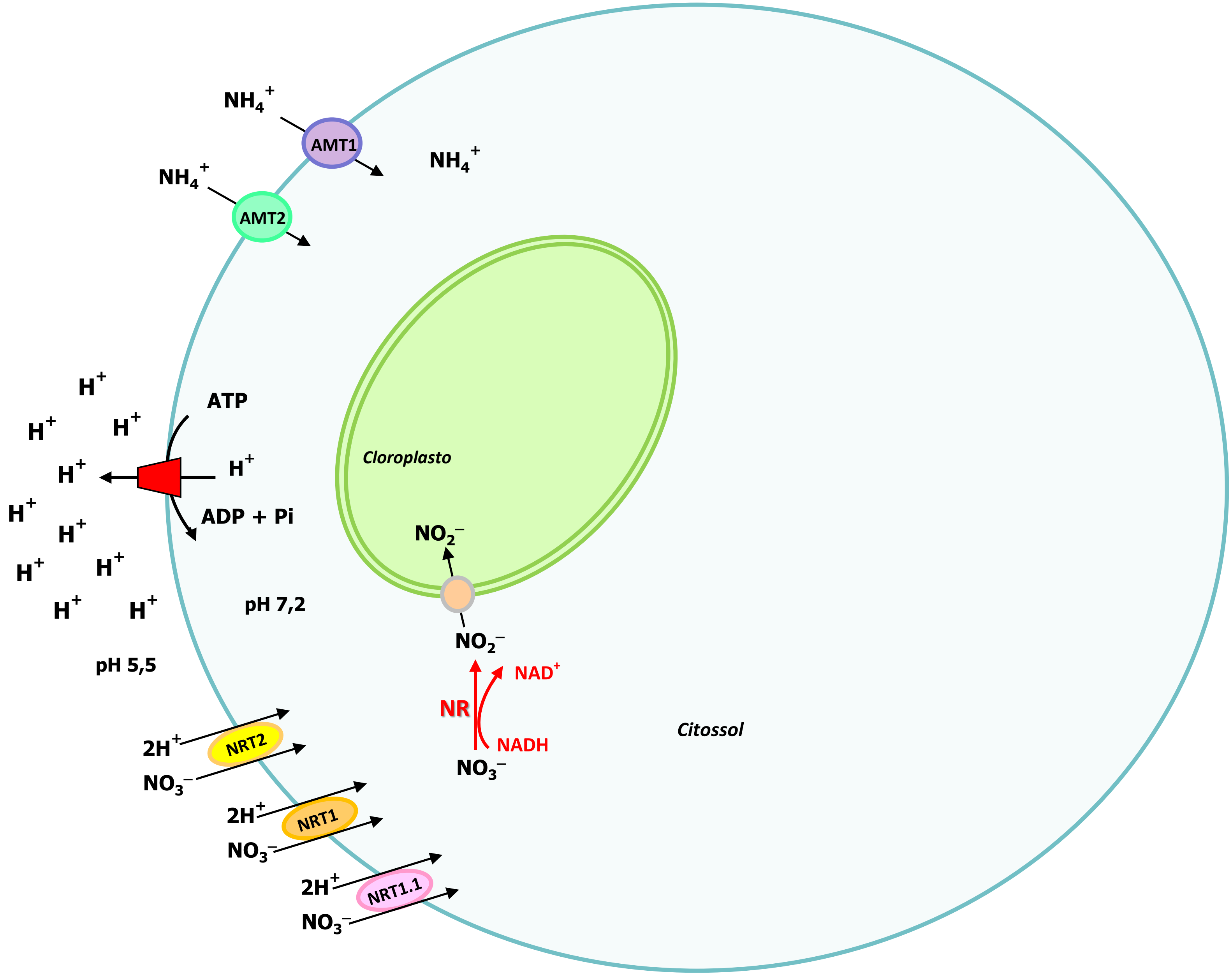
"Assimilação do NO_3^-"



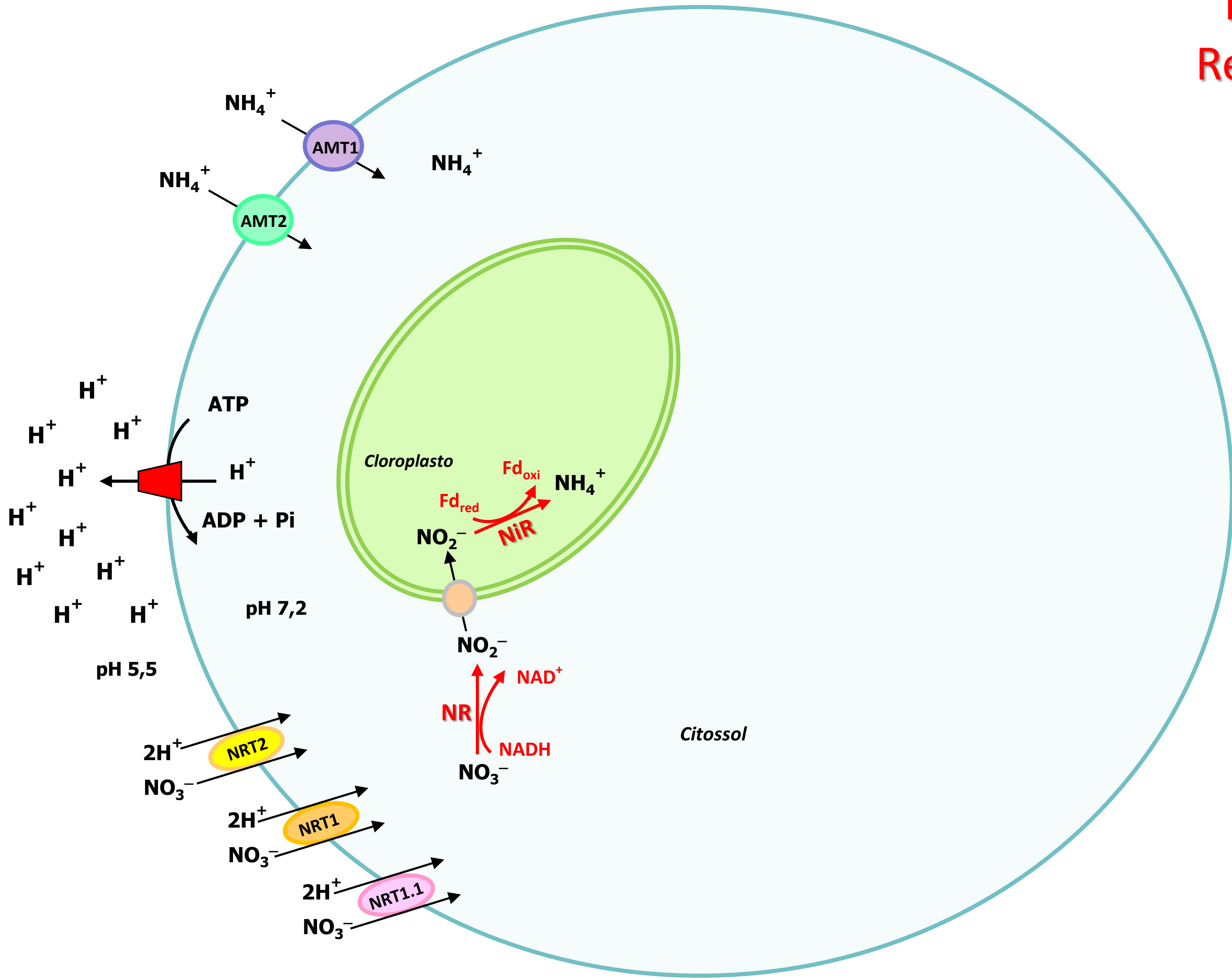
NH4+
AMT1
NH4+
NH4+
AMT2
H+
ATP
H+
H+
H+
H+
ADP + Pi
H+
H+
H+
H+
H+
H+
pH 7,2
pH 5,5
2H+
NRT2
NO3−
Citossol
NO3−
2H+
NRT1
NO3−
2H+
NRT1.1
NO3−

Nitrato Redutase (NR)

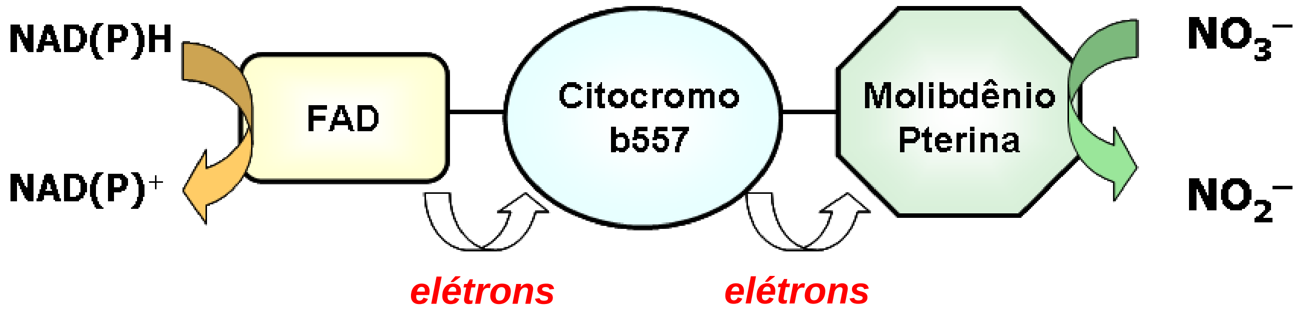



NH4+
AMT1
NH4+
NH4+
AMT2
H+
ATP
H+
H+
H+
H+
ADP + Pi
H+
H+
H+
H+
H+
H+
pH 7,2
pH 5,5
Cloroplasto
NO2−
NO2−
NAD+
NR
NADH
NO3−
Citossol
2H+
NRT2
NO3−
2H+
NRT1
NO3−
2H+
NRT1.1
NO3−

Nitrito Redutase (NiR)

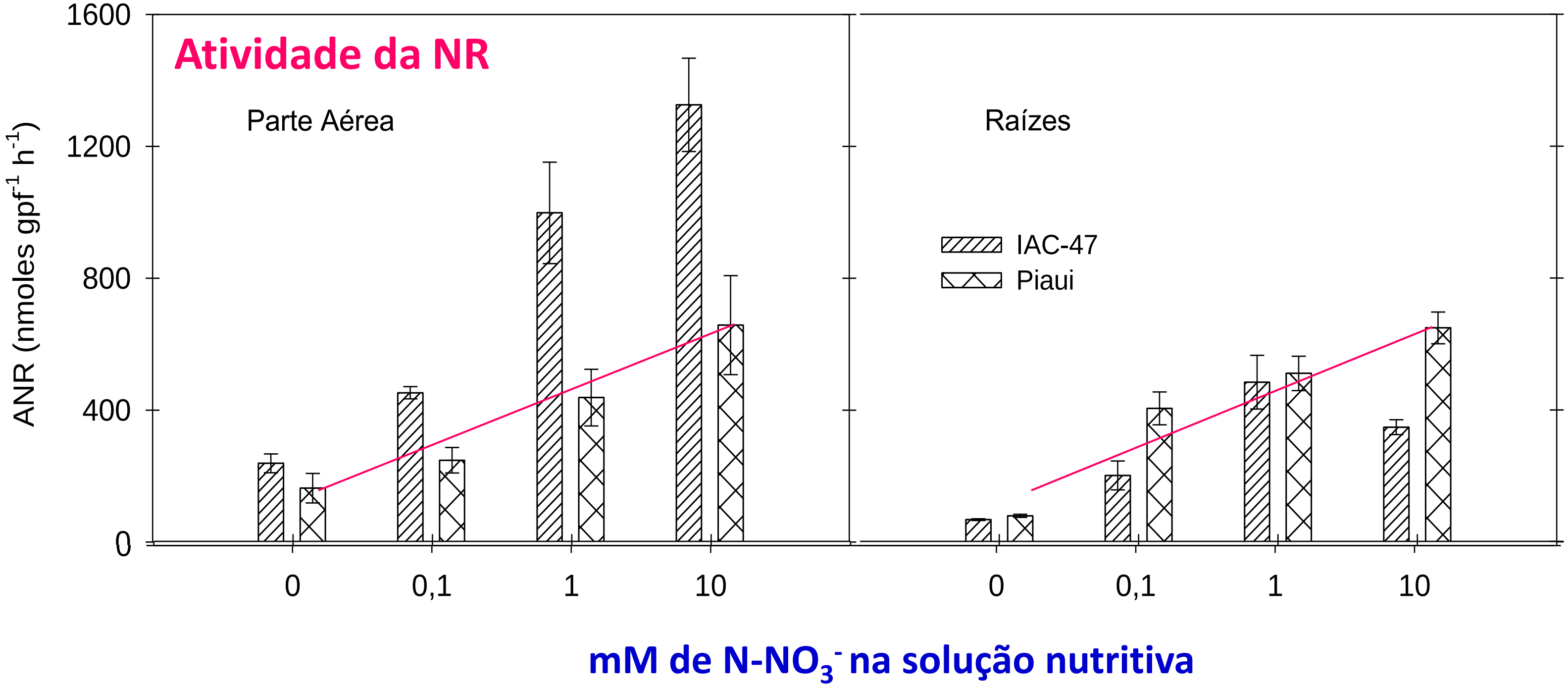


Nitrato Redutase

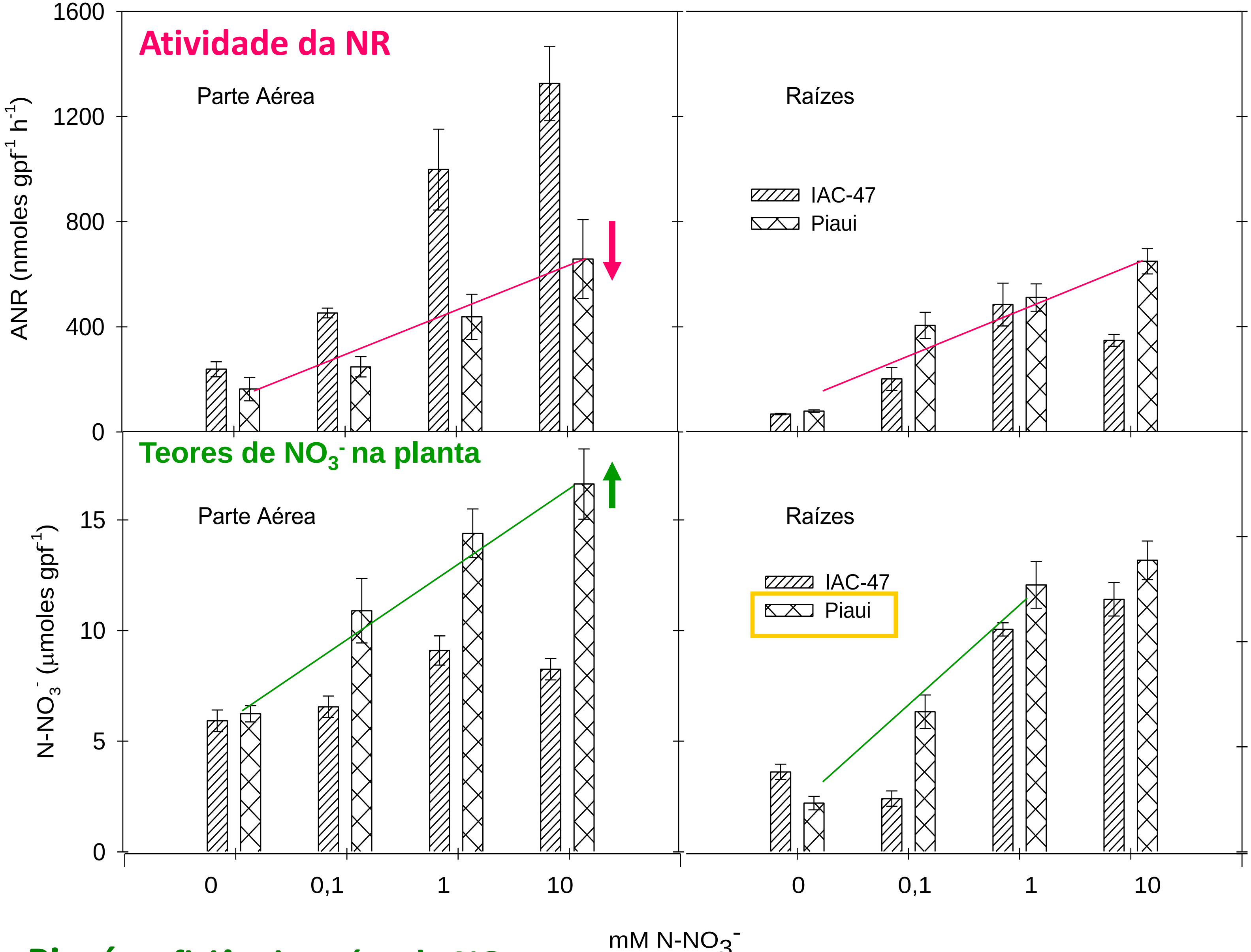


Transferência de elétrons na Nitrato Redutase.

Os elétrons doados pelo NAD(P)H são transferidos pelo FAD, citocromo b557 e cofator molibdênio-pterina até chegarem ao NO_3^- que então é reduzido a NO_2^-.



Variedades de arroz, IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional) submetidas a 4 concentrações de N-NO3- em solução nutritiva (0; 0,1; 1 e 10 mM). (31 dias+48 hs sem N a seguir receberam os tratamentos com N) (Santos, A.M. et al., 2007).

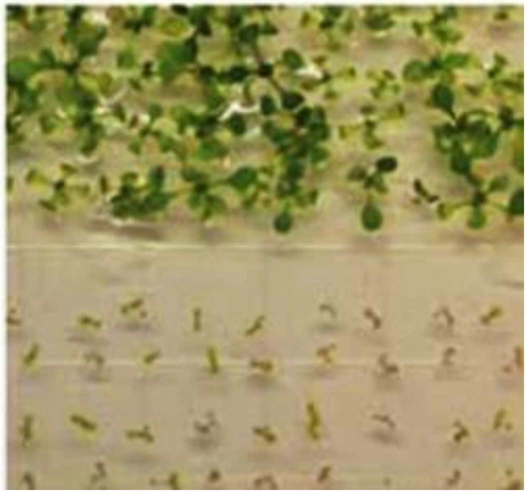


Piauí > eficiência acúmulo NO_3^-

Variedades de arroz, IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional) submetidas a 4 concentrações de N-NO3- em solução nutritiva (0; 0,1; 1 e 10 mM). (31 dias+48 hs sem N a seguir receberam os tratamentos com N) (Santos, A.M. et al., 2007).

Silenciamento da Nitrato Redutase em Arabidopsis

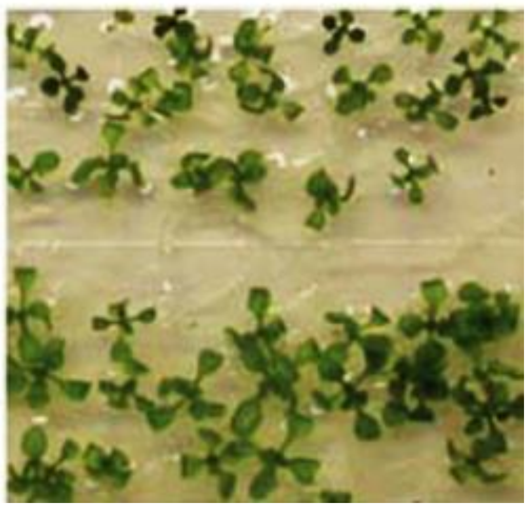
KNO_3



WT

Mutantes - Deleção do gene da NR (*nia*)

NH_4-Suc



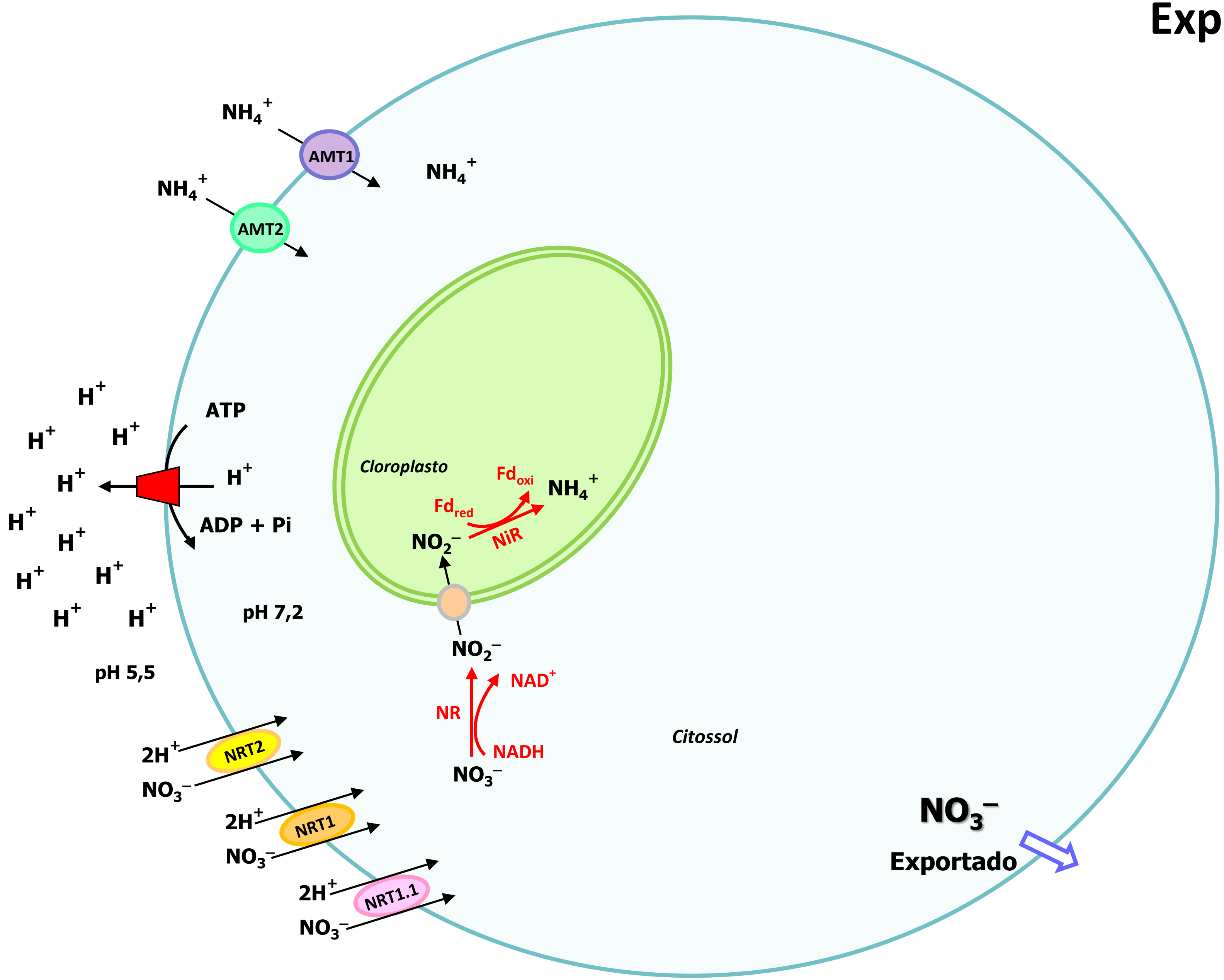
WT

Mutantes - Deleção do gene da NR (*nia*)

Wang et al. (2004)

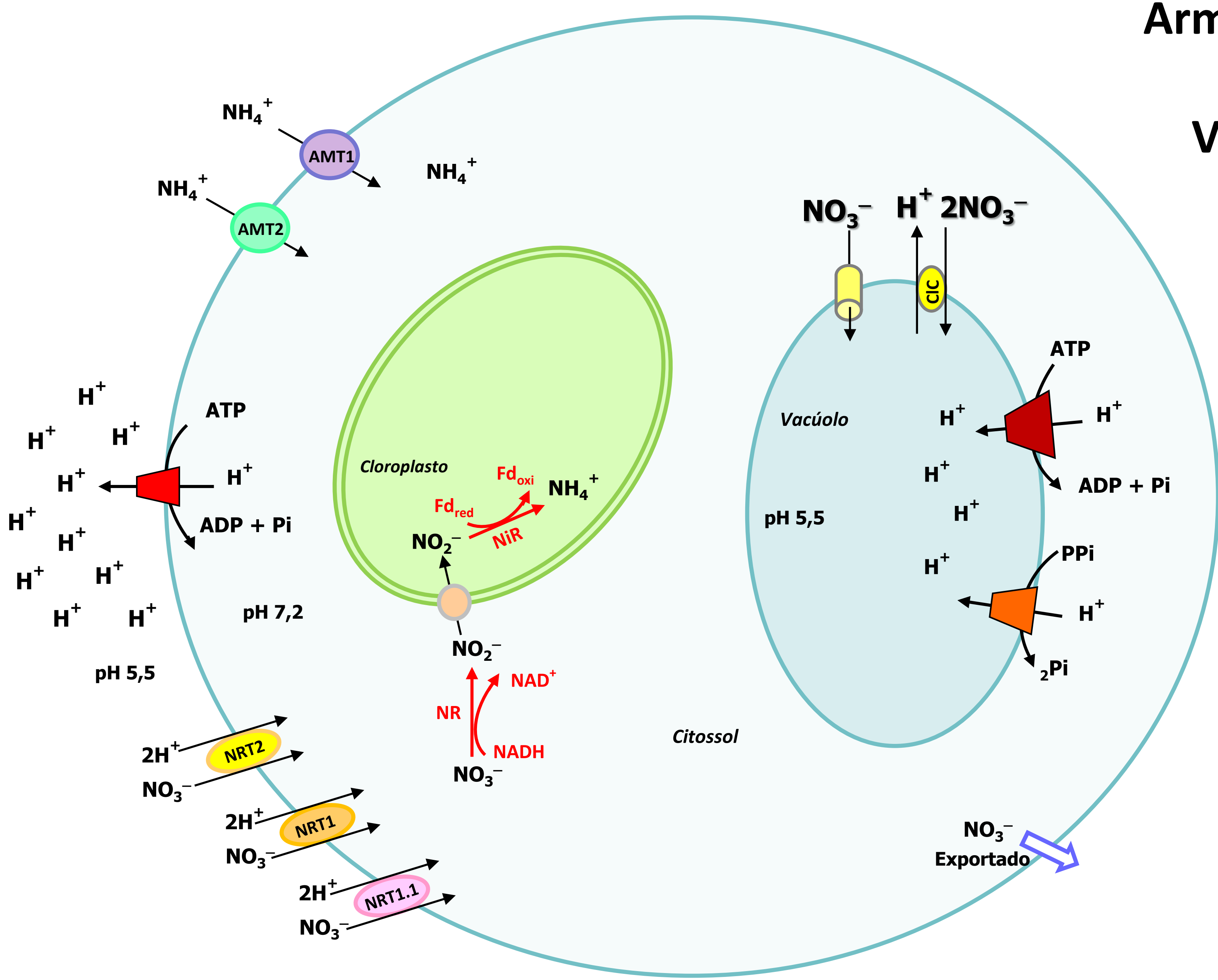
Outros destinos do NO_3^-

Exportado

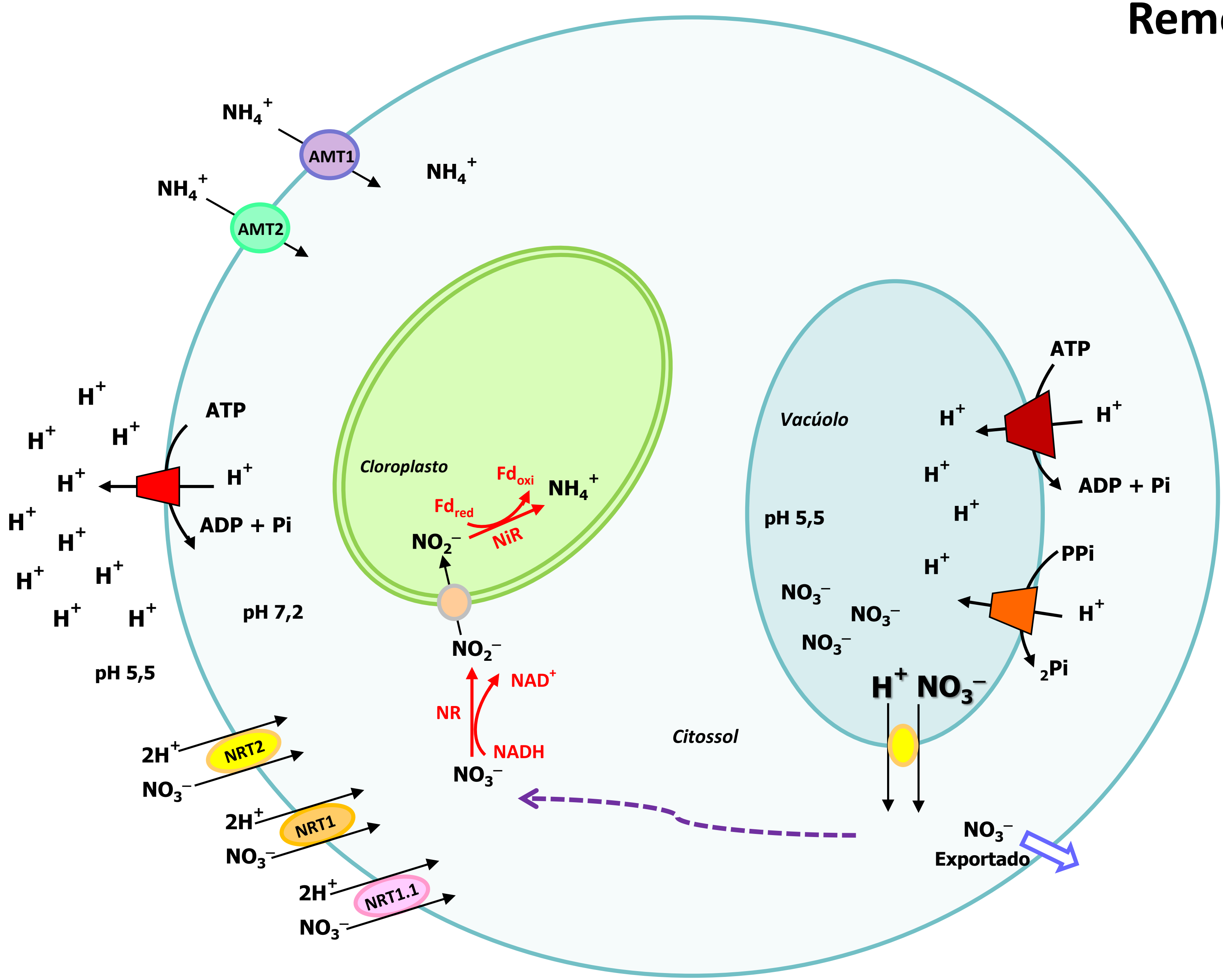


NH4+
AMT1
NH4+
NH4+
AMT2
H+
ATP
H+
H+
H+
H+
H+
ADP + Pi
H+
H+
H+
H+
H+
pH 7,2
pH 5,5
Cloroplasto
Fdoxi
NH4+
Fdred
NO2−
NiR
NO2−
NAD+
NR
NADH
NO3−
Citossol
2H+
NRT2
NO3−
2H+
NRT1
NO3−
2H+
NRT1.1
NO3−
NO3−
Exportado

Armazenado no Vacúolo

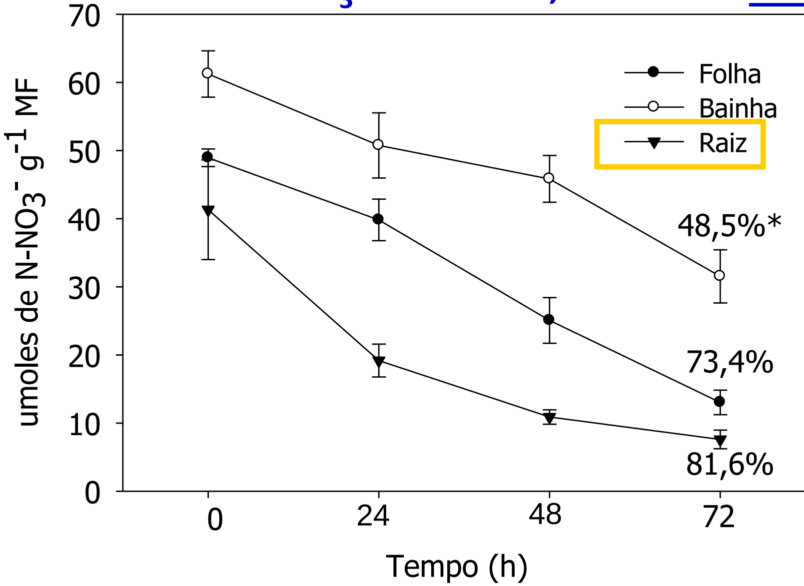


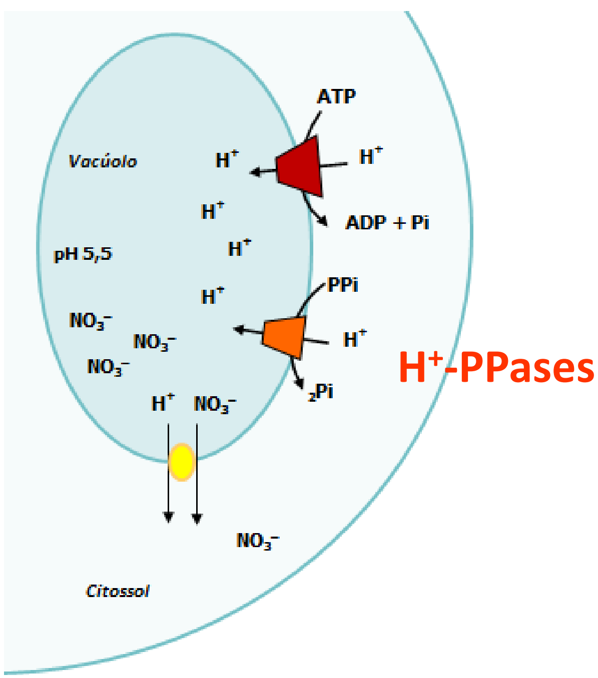
Remobilizado



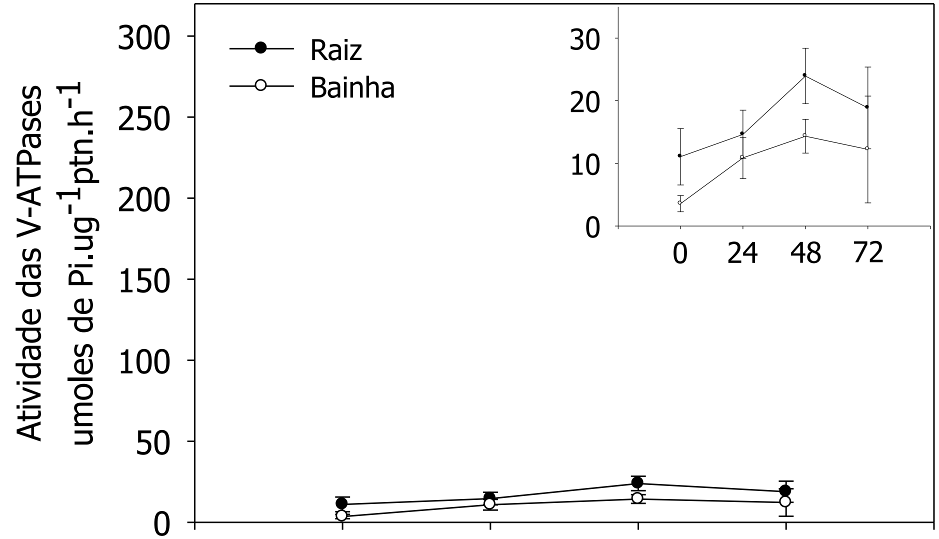
Após retirada do NO_3^- da solução nutritiva (arroz):

Os teores de NO_3^- nas folhas, bainhas e raízes:

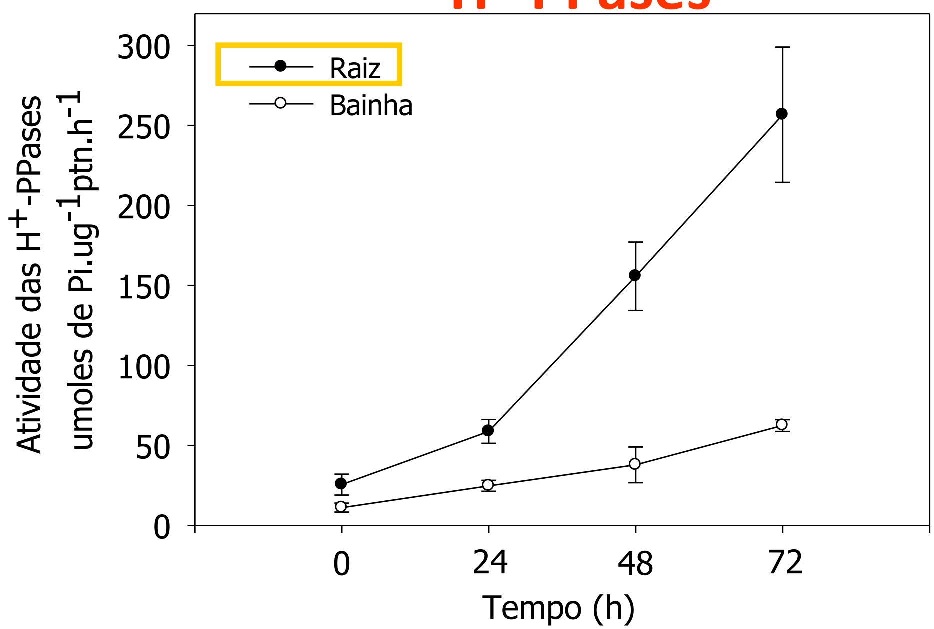




V-H^+-ATPases



H^+-PPases



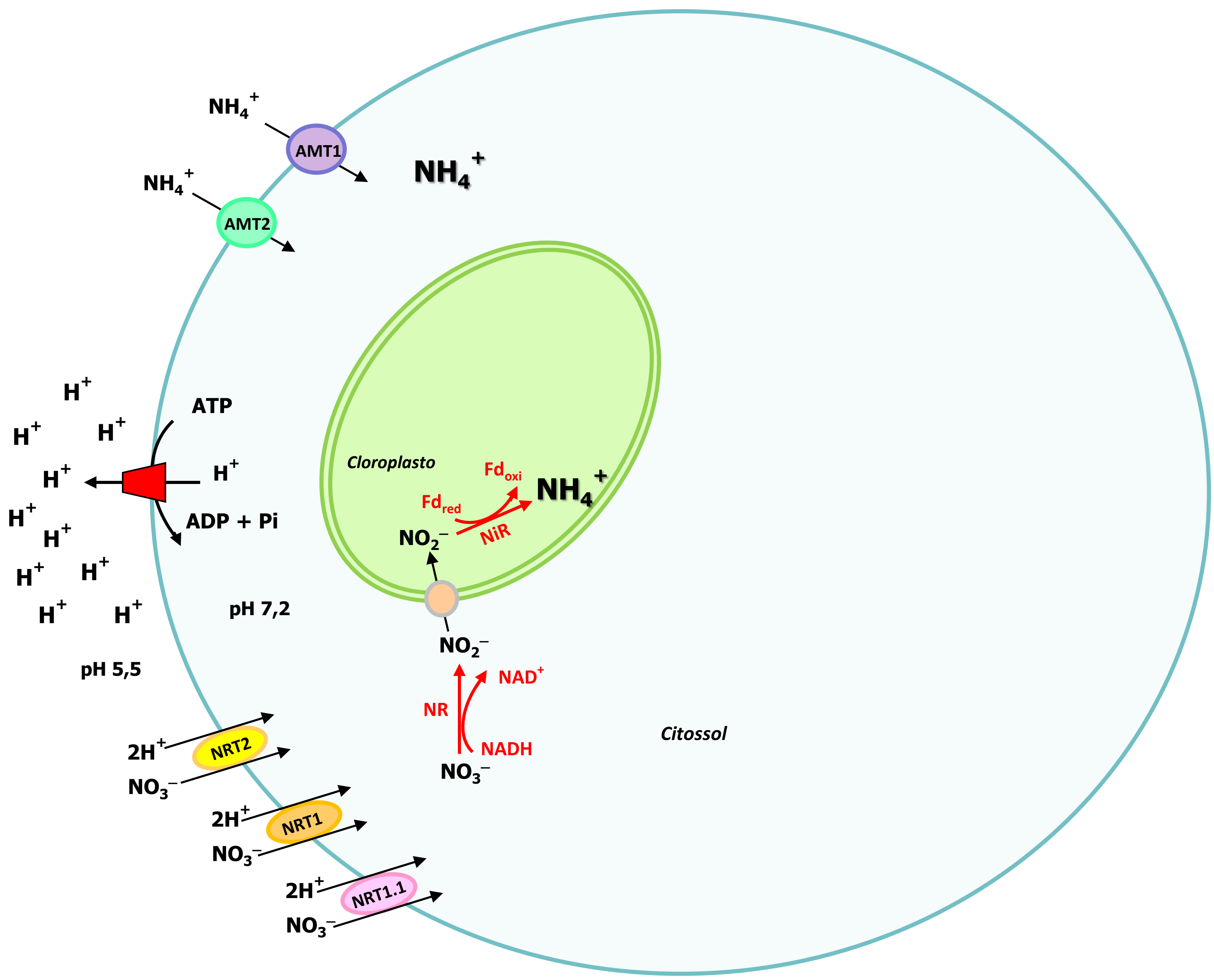
Tempo após retirada do NO_3^- da solução nutritiva

Santos et al., 2011

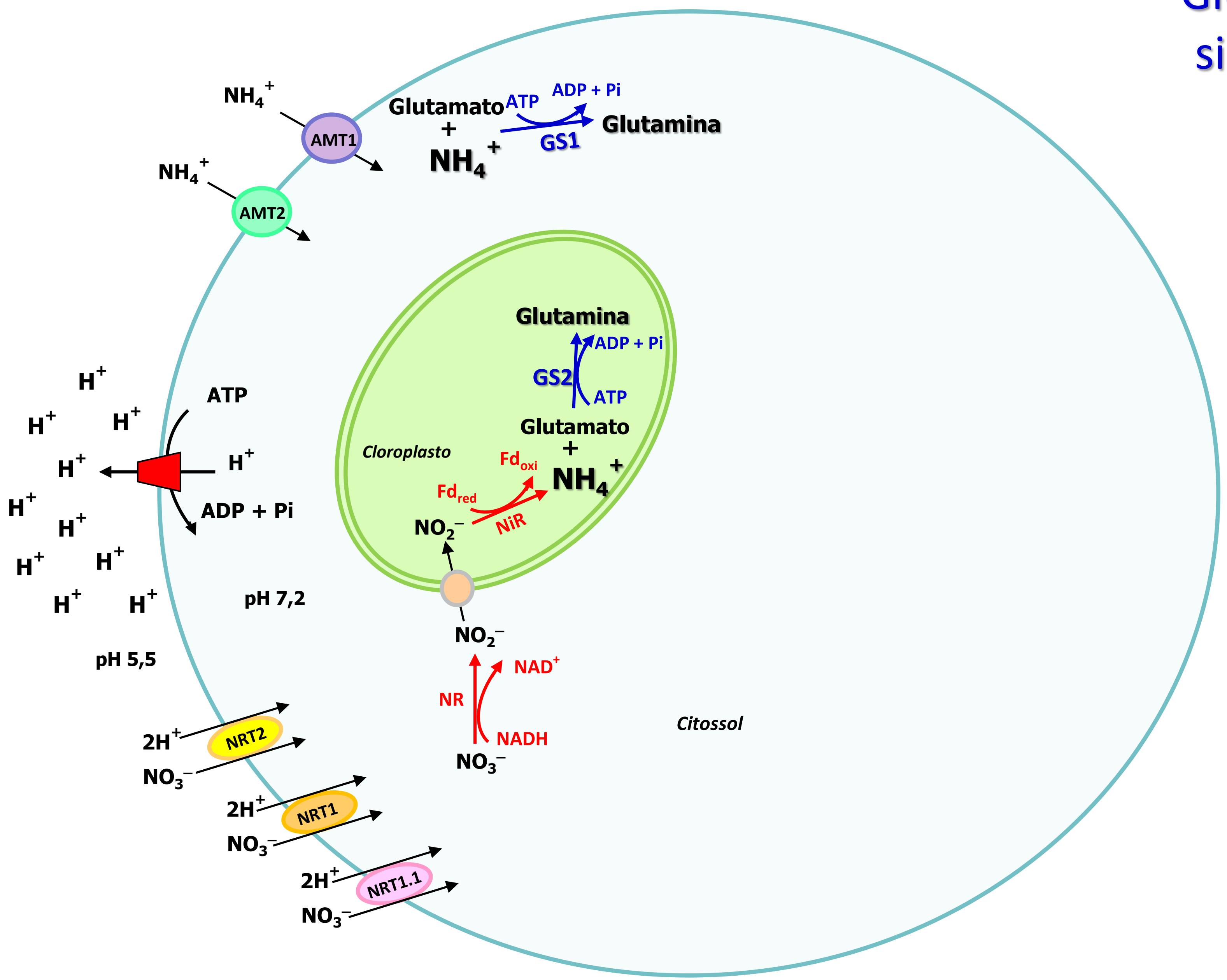
Assimilação do NH_4^+

GS, GOGAT

GDH

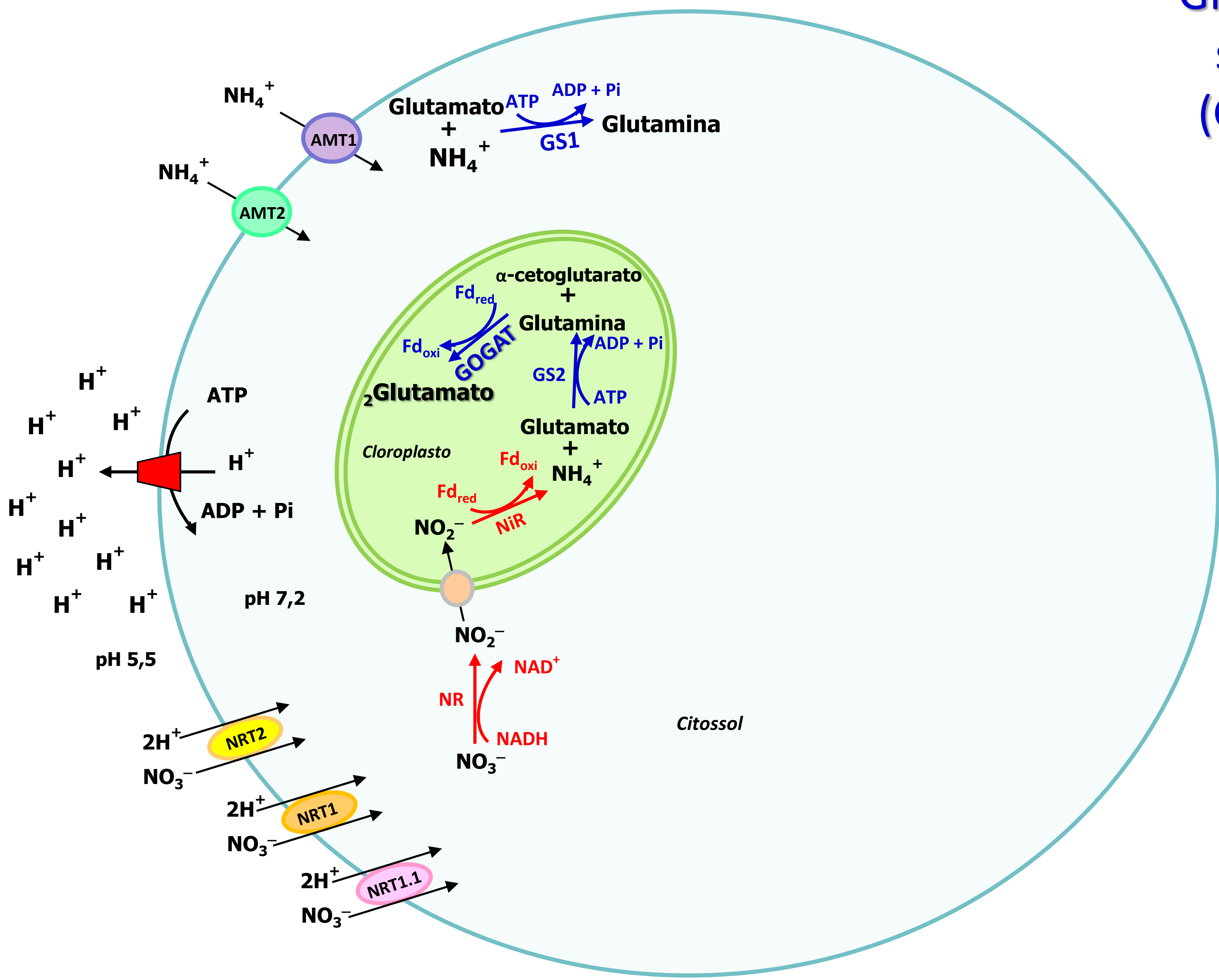


NH4+
AMT1
NH4+
AMT2
NH4+
H+
ATP
H+
H+
H+
H+
ADP + Pi
H+
H+
H+
H+
H+
pH 7,2
pH 5,5
Cloroplasto
Fdoxi
NH4+
Fdred
NiR
NO2−
NO2−
NAD+
NR
NADH
NO3−
Citossol
2H+
NRT2
NO3−
2H+
NRT1
NO3−
2H+
NRT1.1
NO3−

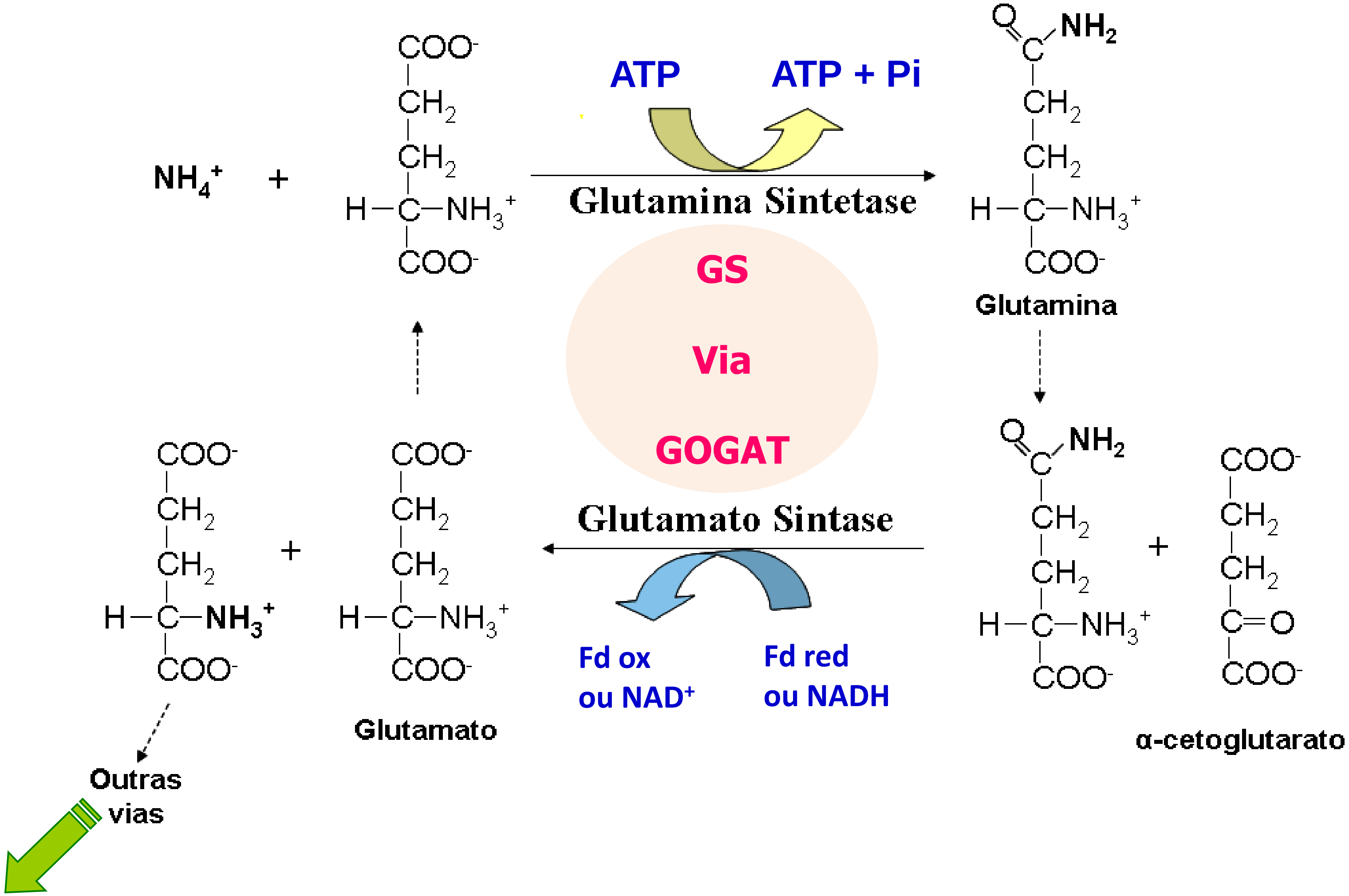


Glutamina sintetase
GS1
GS2

Glutamato sintase (GOGAT)



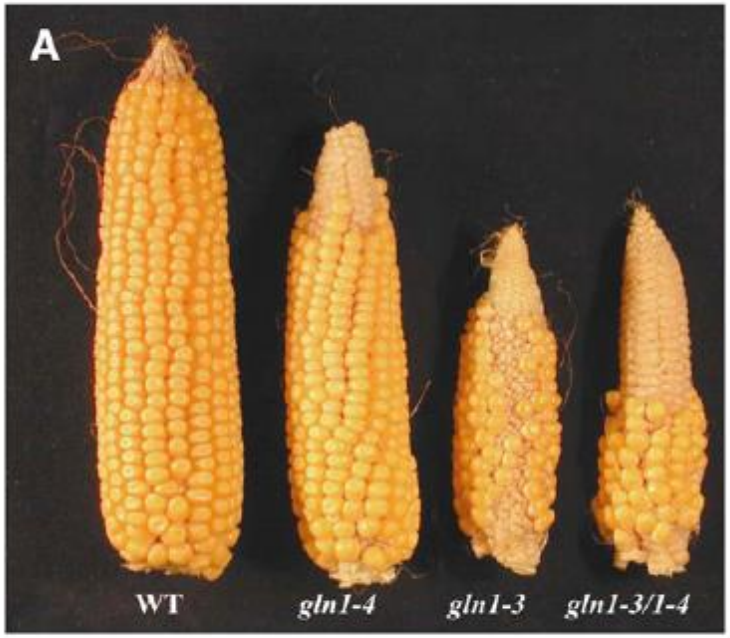
Via Glutamina Sintetase-Glutamato sintase (GS-GOGAT)



Esquema representativo da Via Glutamina Sintetase-Glutamato sintase (GS-GOGAT) para a assimilação de amônio. **(Fdox = ferredoxina oxidada e Fdred = Ferredoxina reduzida).**

(Souza e Fernandes, 2006).

Knockout das isoformas de GS1: *gln1-3* e *gln1-4*

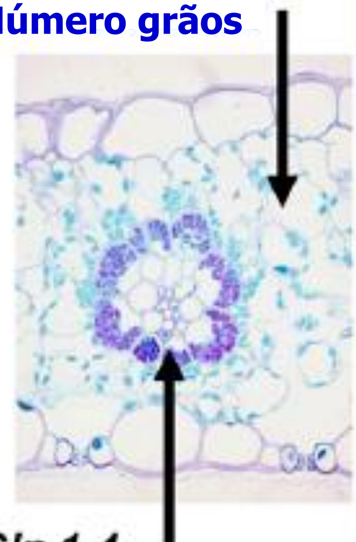


Phenotype of the Shoot in GS1-Deficient Mutants.

Gln 1-3

(Cels. do Mesófilo foliar)

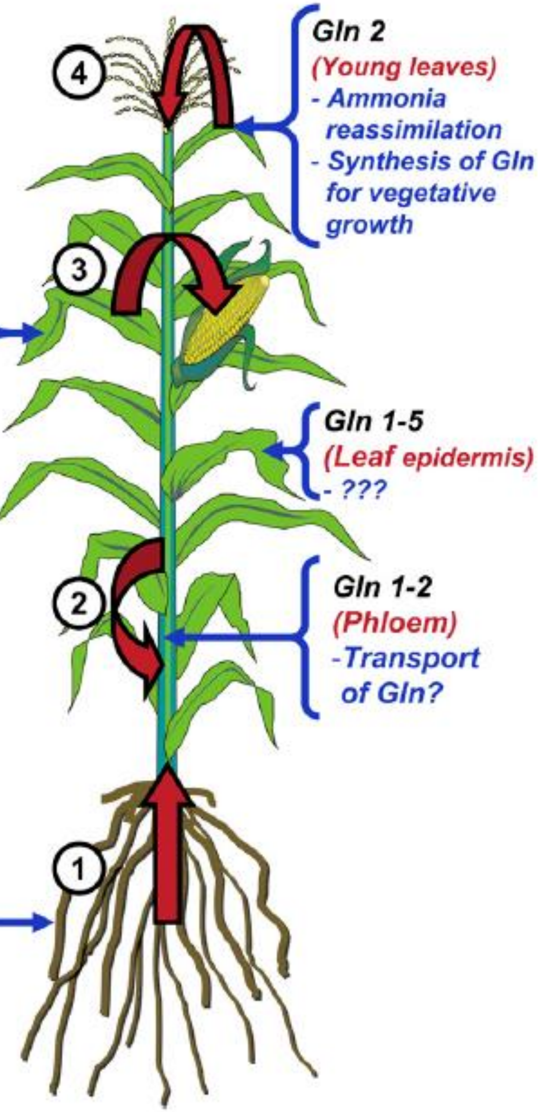
- Número grãos



Gln 1-4

(Cels. da bainha vascular das folhas)

- Tamanho do grão



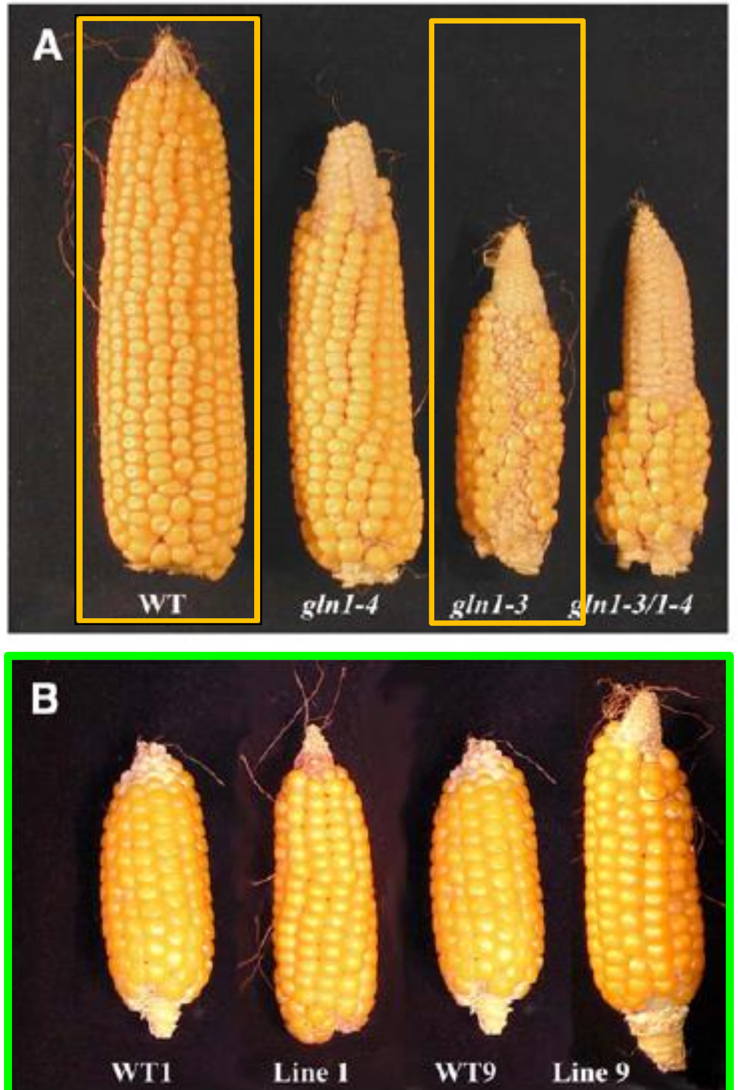
Gln 1-1

(Root cortex)

- Synthesis of Gln for vegetative growth

(Martin et al., 2006)

Knockout da GS1
(*gln1-3* e *gln1-4*)



***Gln1.3* - Número de grãos**

Superexpressão da GS1 (Gln1-3)

- **Aumento do número de grãos em 30%**

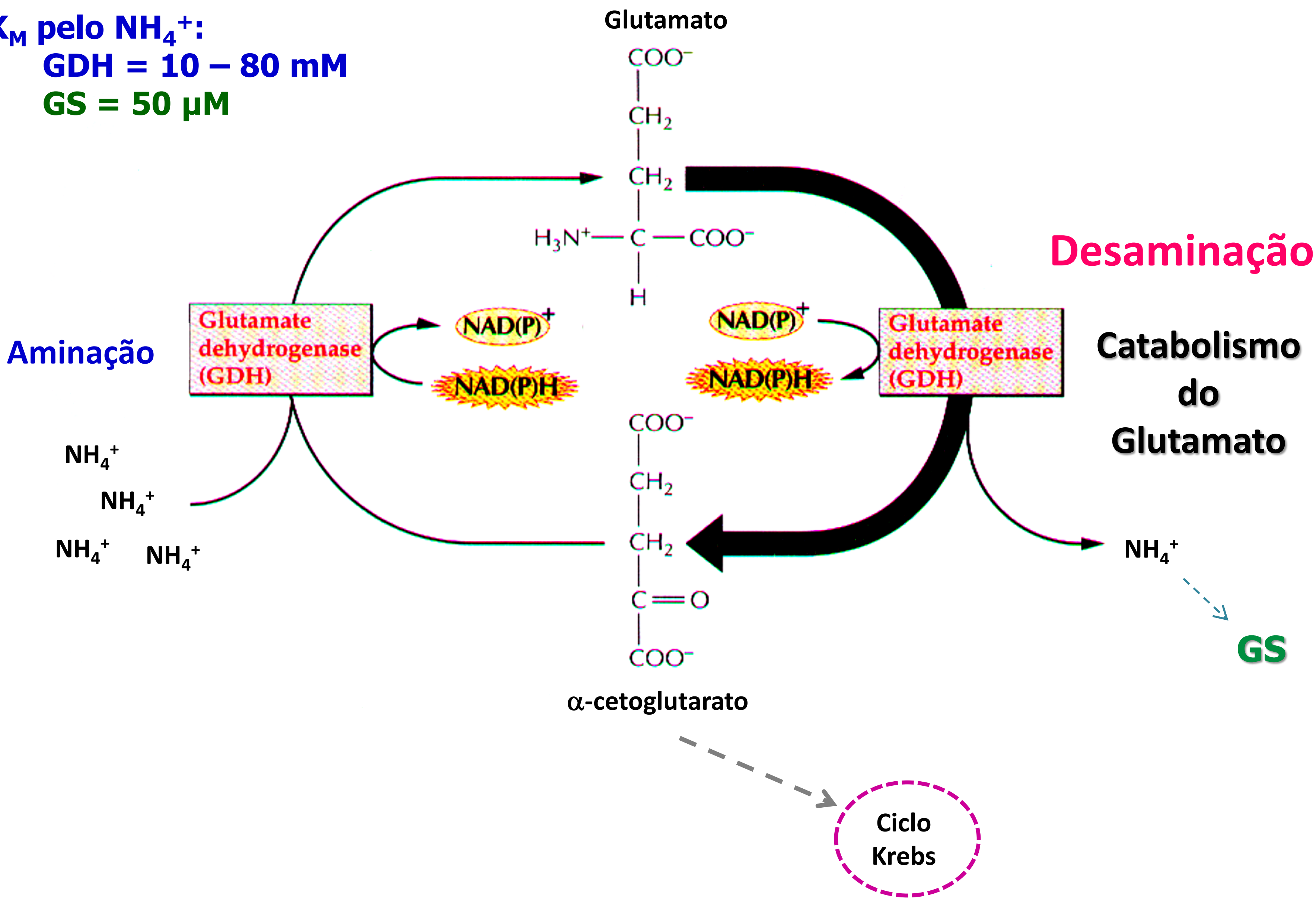
(Martin et al., 2006)

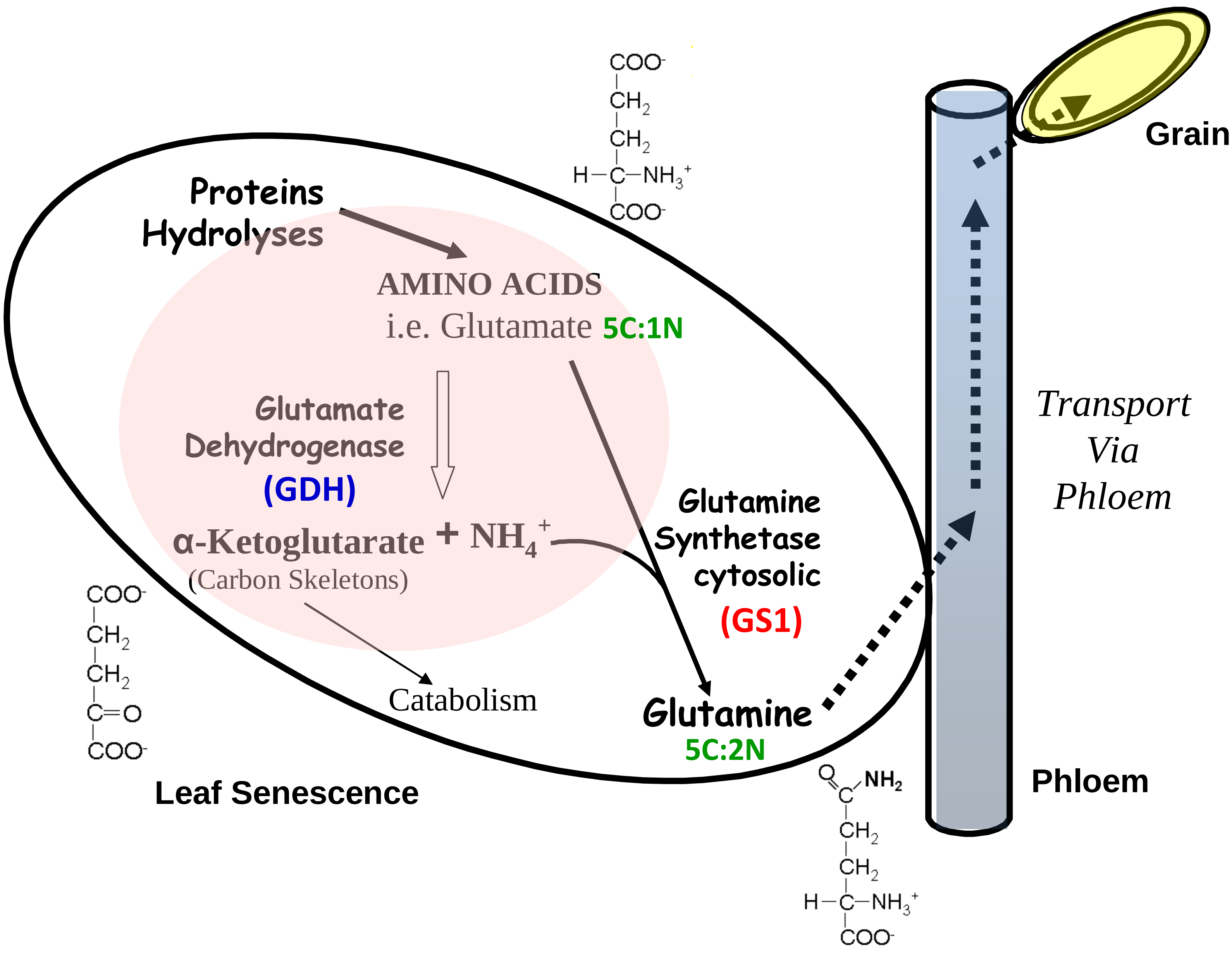
Glutamato desidrogenase de plantas (GDH)

K_M pelo NH_4^+:

GDH = 10 – 80 mM

GS = 50 µM





Proteins
Hydrolyses
AMINO ACIDS
i.e. Glutamate 5C:1N
Glutamate
Dehydrogenase
(GDH)
α-Ketoglutarate + NH4+
(Carbon Skeletons)
Catabolism
Glutamine
Synthetase
cytosolic
(GS1)
Glutamine
5C:2N
Leaf Senescence
Transport
Via
Phloem
Grain
Phloem

Metabolismo de senescencia

GDH desaminação

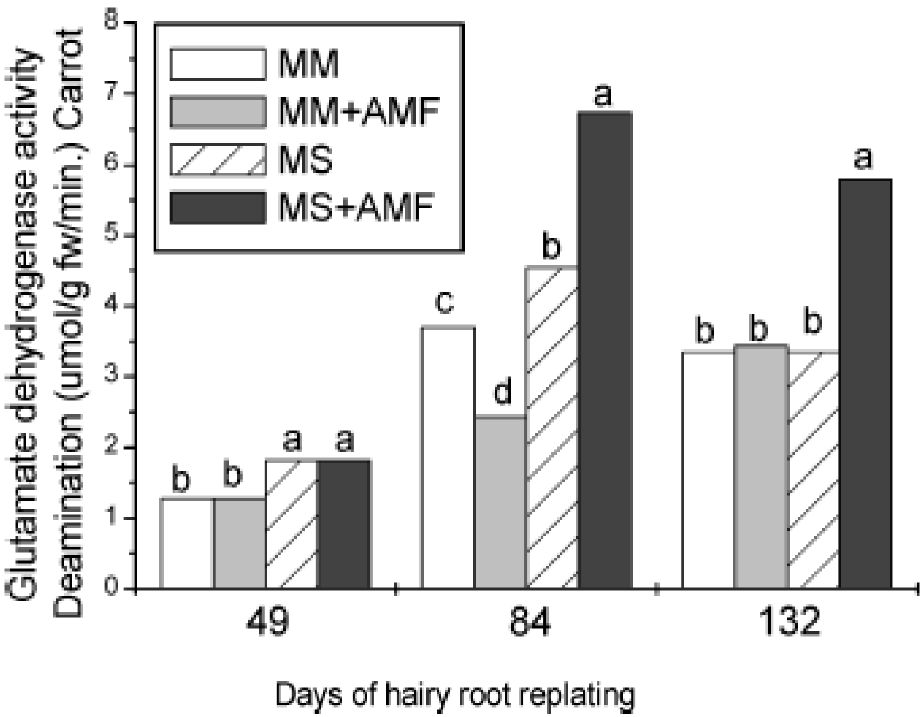
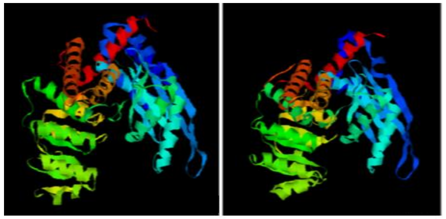


Figure 1. Glutamate synthase activity (μmol/g fresh weight/min) in carrot and clover hairy roots, grown on minimum medium (MM) or Murashige and Skoog (MS) medium, in the presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Harvests at 49/21, 84/56 and 132/111 days of root replating/fungal inoculation. For the same harvest, values followed by the same letters did not differ significantly from one another (Tukey test, $p < 0.05$).

(Souza et al, 2007).

Superexpressão de GDH de fungo (*Cylindrocarpon ehrenbergii*) *Ce*GDH em arroz

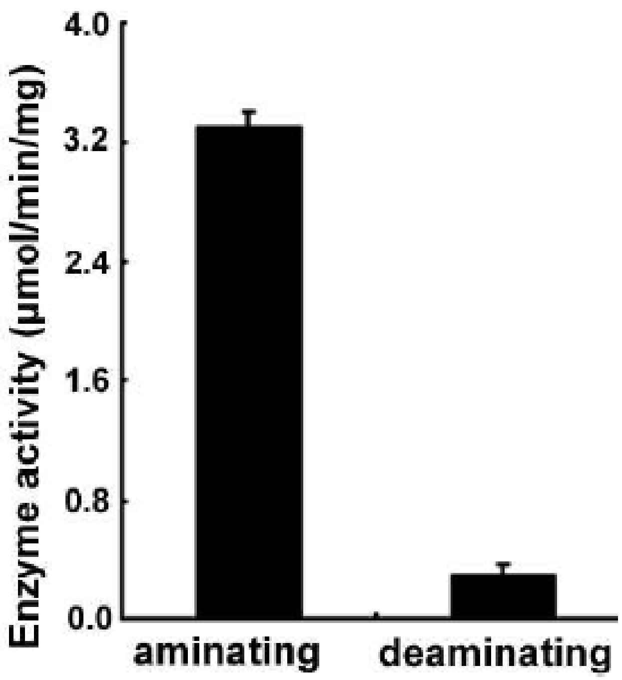
Estrutura espacial



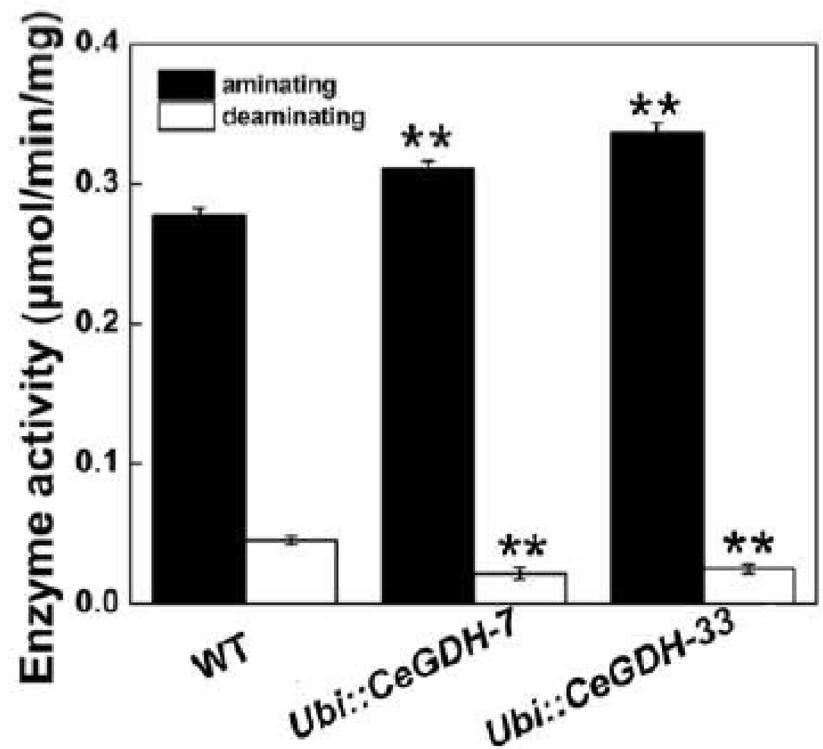
GDH arroz GDH Fungo

α-cetoglutarato + $NH_4^+ \rightarrow$ Glutamato

> Atividade GDH aminação



Atividade GDH *in vitro*



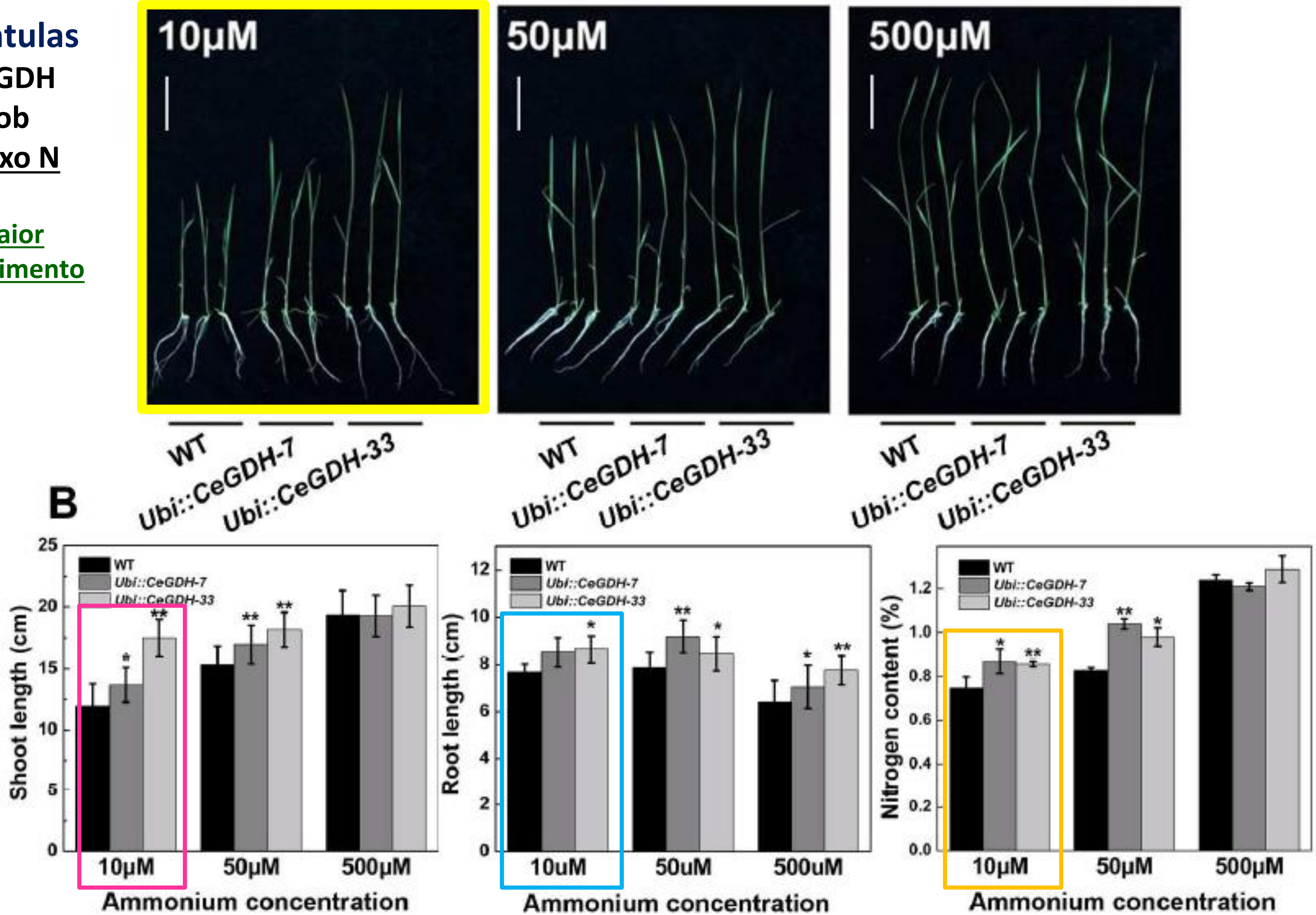
Atividade GDH *in vivo*

Zhou et al., 2014

Arroz superexpressando GDH de fungo (*Cylindrocarpon ehrenbergii*) *Ce*GDH

Plântulas
***Ce*GDH**
Sob
Baixo N

Maior crescimento



Zhou et al., 2014

Arroz superexpressando GDH de fungo (*Cylindrocarpon ehrenbergii*) *Ce*GDH

Aumento da produção de grãos e nº. panículas sob baixo N

Table 1 Phenotypic and agronomic traits statistics of mature transgenic lines in nitrogen gradient field cultivation experiment

Nitrogen fertilizer gradient in field (kg N/ha)	Line	1,000-grain weight (g)	Panicle number/hill	Filled grains rate (%)	Grain yield per plant (g/hill)
37.5	WT	24.5 ± 0.9	15.3 ± 3.2	87.1 ± 1.9	14.6 ± 3.9
37.5	*Ubi::CeGDH-7*	26.4 ± 1.2**	27.1 ± 5.3**	86.8 ± 4.0	24.5 ± 6.3**
37.5	*Ubi::CeGDH-33*	24.6 ± 0.7	26.5 ± 10.8**	84.3 ± 6.4	19.9 ± 5.4*
112.5	WT	23.4 ± 0.8	31.0 ± 11.3	88.0 ± 1.7	28.8 ± 10.4
112.5	*Ubi::CeGDH-7*	25.9 ± 2.0**	26.3 ± 6.2	86.8 ± 4.1	21.9 ± 5.5*
112.5	*Ubi::CeGDH-33*	23.0 ± 0.9	20.9 ± 2.6**	85.3 ± 6.2	27.5 ± 2.6

Data represent the average values SEM (n=20). $P \leqslant 0.05$(*) and $P \leqslant 0.01$(**), student's t test.

Cultivo em condições de campo
>eficiência uso N

Zhou et al., 2014

Superexpressão de fator de transcrição

Superexpressão do Dof25 de arroz em Arabidopsis

(35*S*:*OsDof25*)

WT – planta não transformadas

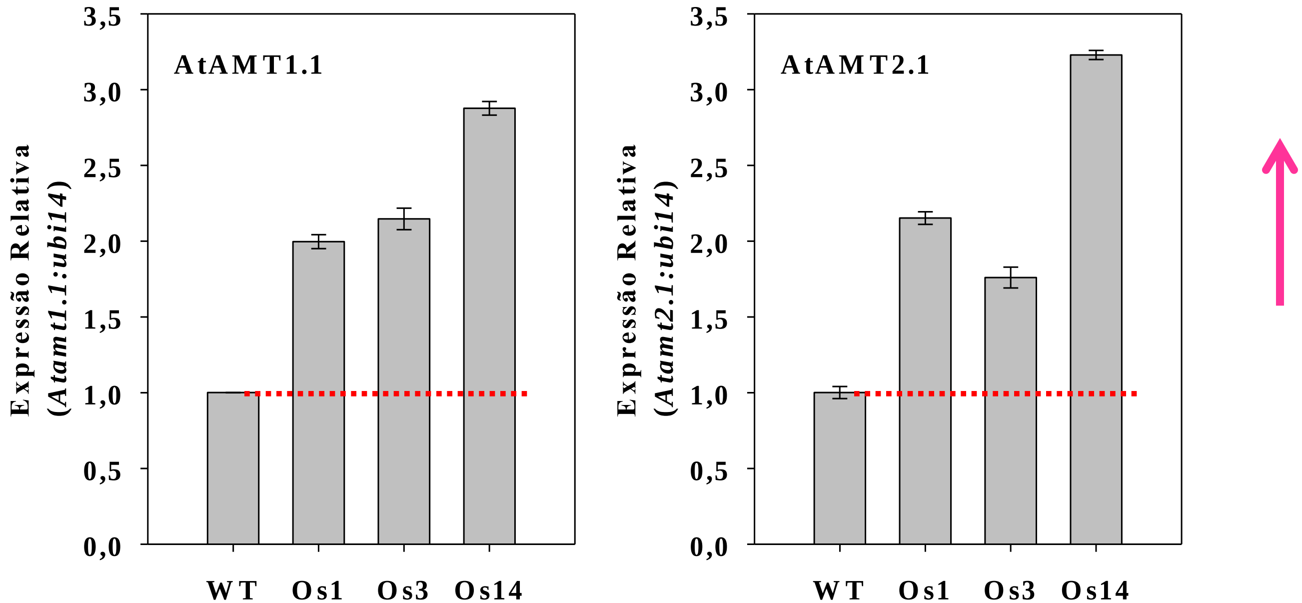
Maior crescimento

terra:fibra de coco na proporção 2:1

(Santos et al., 2012)

Arabidopsis Superexpressando Dof25 de arroz

Expressão de AMT1 e AMT2

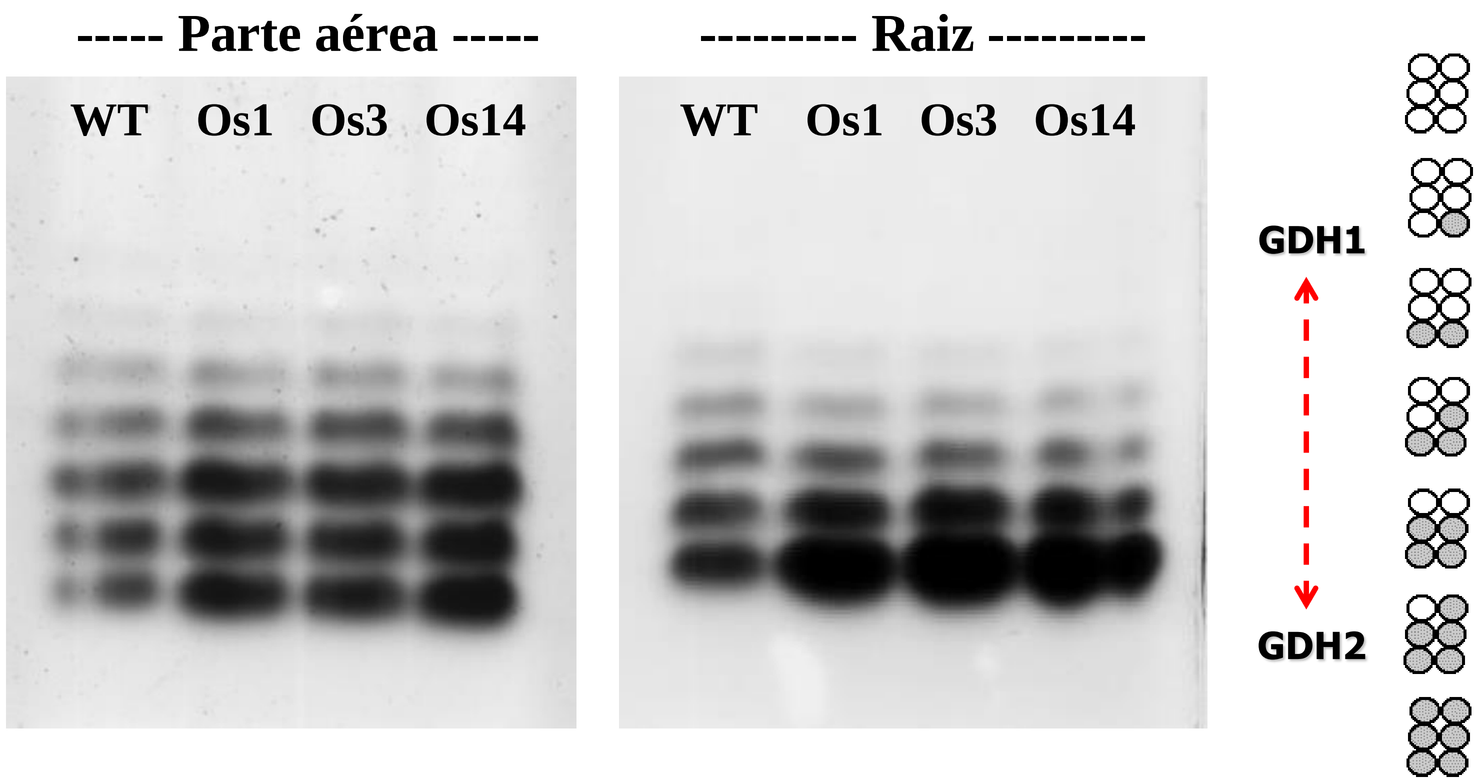


Expressão gênica de transportadores de NH_4^+ de alta (AtAMT1.1) e baixa afinidade (AtAMT2.1) em linhagens de Arabidopsis superexpressando *Osdof25* e WT.

(Santos et al., 2012)

Arabidopsis Superexpressando Dof25 de arroz

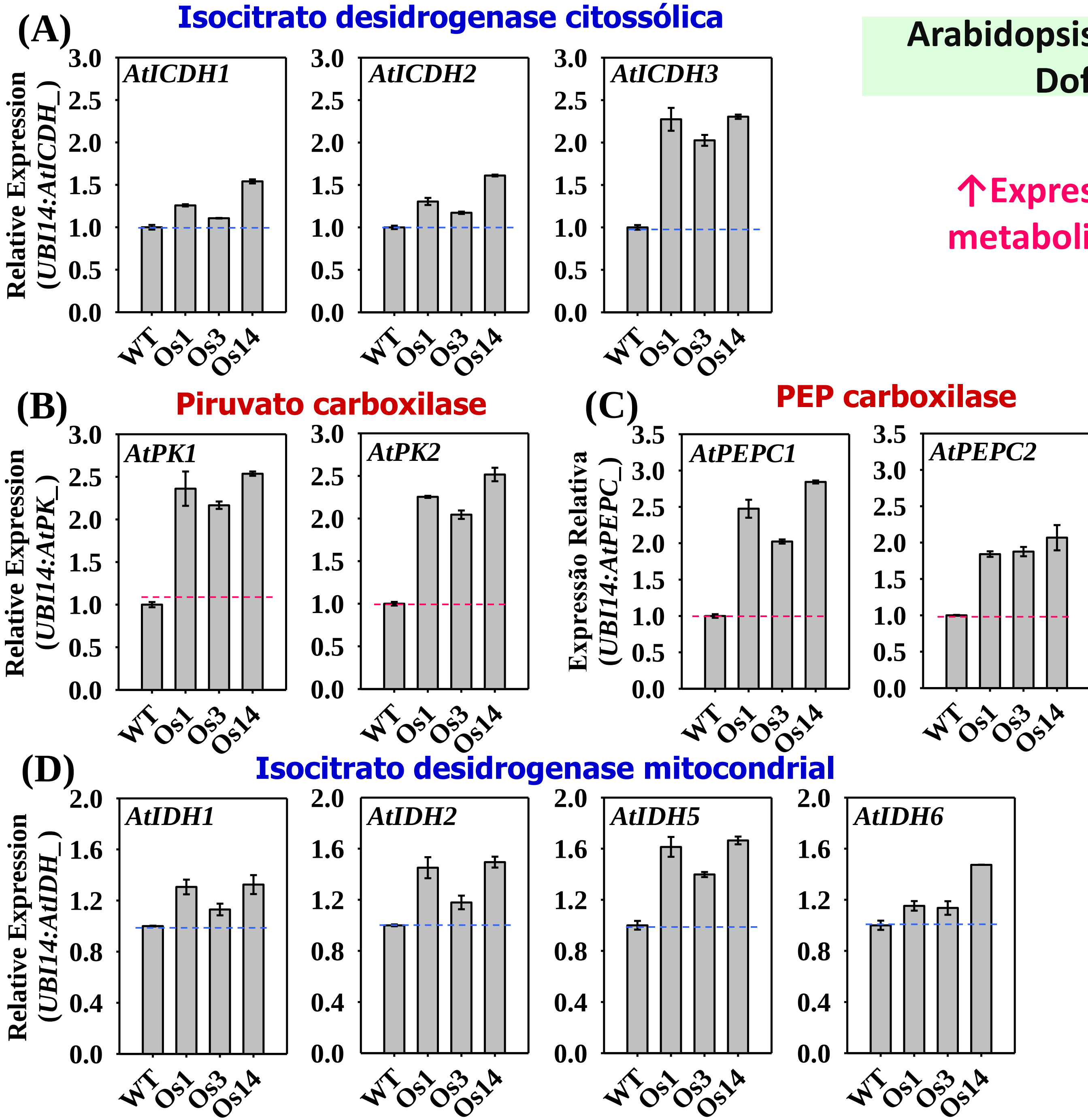
>Atividade GDH



Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) em gel nativo de poliacrilamida, mostrando suas sete isoenzimas.

(Santos et al., 2012)

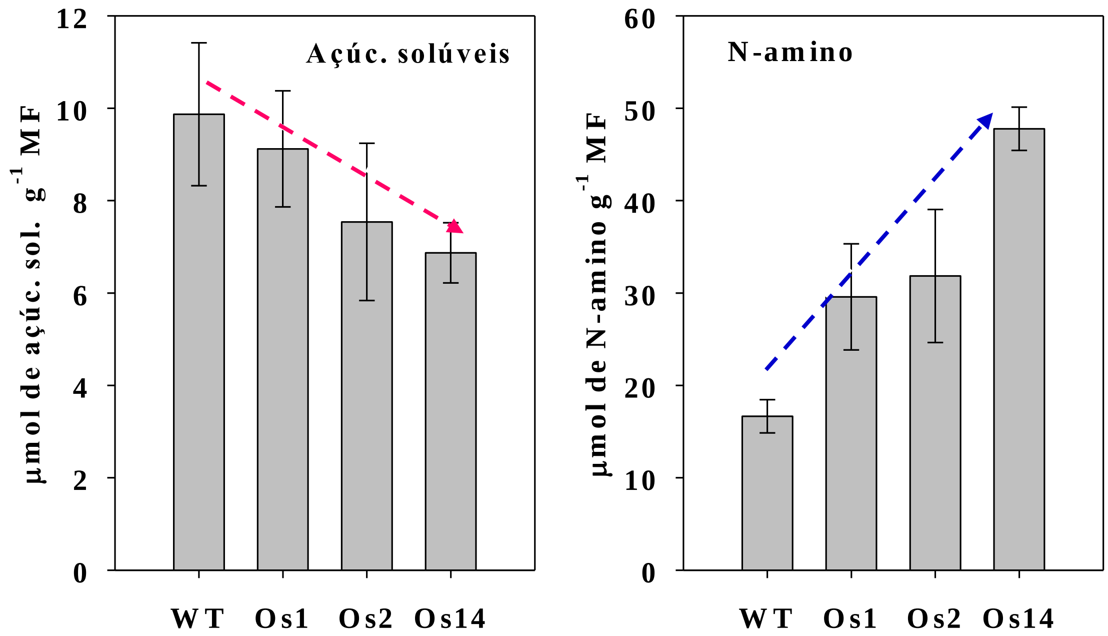
Arabidopsis Superexpressando Dof25 de arroz



↑Expressão de genes do metabolismo de carbono.

(Santos et al., 2012)

Arabidopsis Superexpressando Dof25 de arroz



Superexpressão proteína regulatória:

- **Absorção e metabolismo de N**
- **Metabolismo de ácidos orgânicos (C)**
- **Maior crescimento sob baixo N**

(Santos et al., 2012)

Eficiência de Absorção e Uso de N

Superexpressão e silenciamento de genes:

- **Absorção e metabolismo do N**
- **Proteínas regulatórias**
- **Fatores de transcrição**
- **Proteínas relacionadas ao metabolismo de C**

- **Genômica**
- **Transcriptômica**
- **Metabolômica**
- **Proteômica**
- **Epigenômica #**

➢ **Identificação de variedades mais eficientes, em agricultura de baixos insumos**

Obrigada!

Sonia Regina de Souza

Laboratório de Bioquímica e Nutrição de Plantas, Depto. de Química, ICE, UFRRJ. BR 465 km 47, CEP: 23895-000 – Seropédica - RJ, sonia_ufrrj@yahoo.com.br