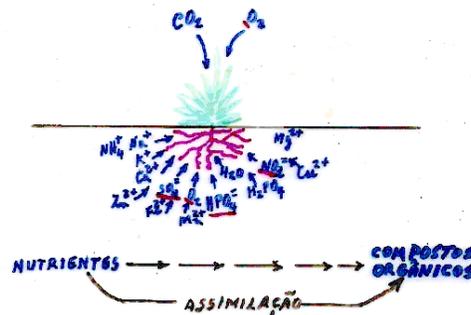


## UNIDADE IX – Assimilação de nutrientes minerais

1. Introdução
2. Utilização de nitrogênio atmosférico: Fixação
  - 2.1. Amonificação, nitrificação, desnitrificação e o ciclo do nitrogênio
  - 2.2. Fixação industrial
  - 2.3. Fixação natural
3. Redução metabólica do nitrato
4. Assimilação da amônia
5. Efeitos da assimilação de nitrogênio na utilização de carboidratos
  - 5.2.1. Fixação não biológica
  - 5.2.2. Fixação biológica
    - 5.2.2.1. Fixação de nitrogênio de vida livre
    - 5.2.2.2. Fixação simbiótica
  - 5.3. Fisiologia e bioquímica da fixação
6. Transformações do nitrogênio durante o desenvolvimento vegetal
7. Assimilação de sulfato, fosfato, cátions e oxigênio

### Assimilação de nutrientes inorgânicos



A assimilação de alguns nutrientes, particularmente, nitrogênio e enxofre, requer uma série complexa de reações bioquímicas, que estão entre as reações de maior demanda energética dos organismos vivos:

- $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{glutamina}$  (12 ATP/N);
- $\text{N}_2 \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ \rightarrow 2 \text{ glutamina}$  (20 ATP/2 N);
- $\text{SO}_4^{2-} (+6) \rightarrow \text{S}^{2-} (-2) \rightarrow \text{CISTEÍNA}$  (14 ATP/S).

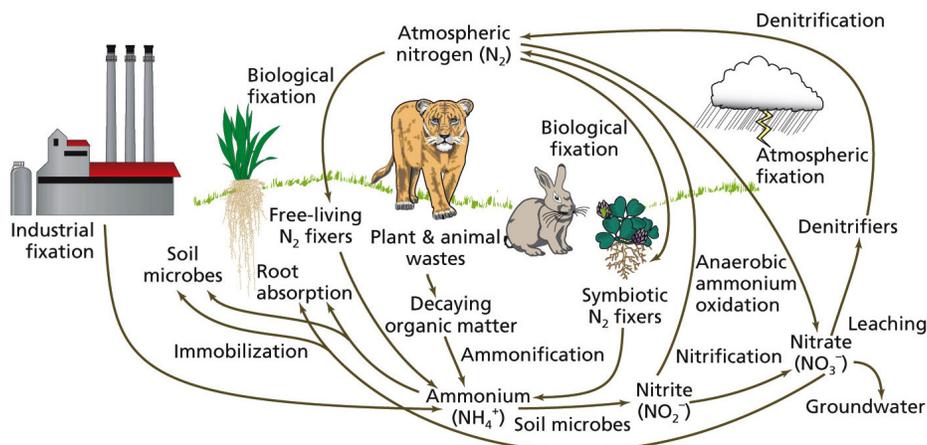
## Utilização do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>): fixação

O N<sub>2</sub> representa 77% da composição de gases da atmosfera. Porém, O N<sub>2</sub> não pode ser utilizado pelas plantas. O N somente é assimilado na forma fixada, ou seja, sob a forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Portanto, **FIXAÇÃO** de N, nada mais é do que conversão do N<sub>2</sub> em nitrato ou amônio.

Esta fixação pode ser **INDUSTRIAL** (100 milhões de toneladas ano<sup>-1</sup> ou 100 x 10<sup>12</sup> g ano<sup>-1</sup>) e **NATURAL**: não biológica (20 x 10<sup>12</sup> g ano<sup>-1</sup>) e biológica (170 x 10<sup>12</sup> g ano<sup>-1</sup>): **fixadores de nitrogênio de vida livre e fixação simbiótica.**

## O nitrogênio passa por diferentes formas no ciclo biogeoquímico



**TABLE 12.1**  
The major processes of the biogeochemical nitrogen cycle

Process	Definition	Rate ( $10^{12}$ g $y^{-1}$ ) <sup>a</sup>
Industrial fixation	Industrial conversion of molecular nitrogen to ammonia	100
Atmospheric fixation	Lightning and photochemical conversion of molecular nitrogen to nitrate	19
Biological fixation	Prokaryotic conversion of molecular nitrogen to ammonia	170
Plant acquisition	Plant absorption and assimilation of ammonium or nitrate	1200
Immobilization	Microbial absorption and assimilation of ammonium or nitrate	N/C
Ammonification	Bacterial and fungal catabolism of soil organic matter to ammonium	N/C
Anammox	Anaerobic ammonium oxidation: bacterial conversion of ammonium and nitrate to molecular nitrogen	N/C
Nitrification	Bacterial ( <i>Nitrosomonas</i> sp.) oxidation of ammonium to nitrite and subsequent bacterial ( <i>Nitrobacter</i> sp.) oxidation of nitrite to nitrate	N/C
Mineralization	Bacterial and fungal catabolism of soil organic matter to mineral nitrogen through ammonification or nitrification	N/C
Volatilization	Physical loss of gaseous ammonia to the atmosphere	100
Ammonium fixation	Physical embedding of ammonium into soil particles	10
Denitrification	Bacterial conversion of nitrate to nitrous oxide and molecular nitrogen	210
Nitrate leaching	Physical flow of nitrate dissolved in groundwater out of the topsoil and eventually into the oceans	36

*Note:* Terrestrial organisms, the soil, and the oceans contain about  $5.2 \times 10^{15}$  g,  $95 \times 10^{15}$  g, and  $6.5 \times 10^{15}$  g, respectively, of organic nitrogen that is active in the cycle. Assuming that the amount of atmospheric  $N_2$  remains constant (inputs = outputs), the *mean residence time* (the average time that a nitrogen molecule remains in organic forms) is about 370 years [(pool size)/(fixation input) =  $(5.2 \times 10^{15}$  g +  $95 \times 10^{15}$  g) /  $(80 \times 10^{12}$  g  $y^{-1}$  +  $19 \times 10^{12}$  g  $y^{-1}$  +  $170 \times 10^{12}$  g  $y^{-1})$ ] (Schlesinger 1997).

<sup>a</sup>N/C, not calculated.

**Os organismos terrestres, o solo e os oceanos contêm cerca de  $5,2 \times 10^{15}$  g,  $95 \times 10^{15}$  g e  $6,5 \times 10^{15}$  g, respectivamente, de nitrogênio orgânico que é ativo no ciclo.**

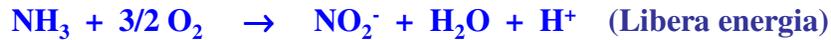
**Admitindo que a quantidade de  $N_2$  na atmosfera permanece constante (entrada = saída), o tempo médio de residência (o tempo médio que a molécula de nitrogênio permanece em formas orgânicas) é cerca de 350 anos.**

**$[(\text{tamanho do pool})/(\text{fixação entrada anual}) = (5,2 \times 10^{15} \text{ g} + 95 \times 10^{15} \text{ g}) / (100 \times 10^{12} \text{ g ano}^{-1} + 19 \times 10^{12} \text{ g ano}^{-1} + 170 \times 10^{12} \text{ g ano}^{-1})]$  (Schlesinger, 1997).**

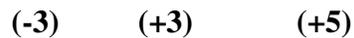
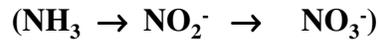
## NITRIFICAÇÃO



### NITROSSOMONAS (QUIMIOAUTOTROFOS)



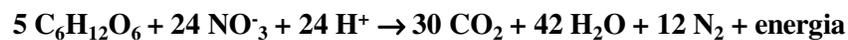
### NITROBACTER (QUIMIOAUTOTROFOS)



OBS: A energia liberada é utilizada para reduzir o  $\text{CO}_2$  a  $\text{C}(\text{H}_2\text{O})$  nestas bactérias.

## Desnitrificação

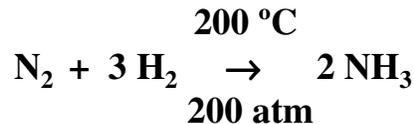
- Algumas bactérias anaeróbicas reduzem o  $\text{NO}_3^-$  para nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ), o qual é perdido para a atmosfera (210 milhões de toneladas por ano).
- Estas bactérias (*Pseudomonas* e *Clostridium*) utilizam o  $\text{NO}_3^-$ , no lugar do  $\text{O}_2$ , como receptor final de elétrons para a respiração.
- Este processo é comum em ambientes pobres em oxigênio (como em solos inundados ou compactados).



## Fixação industrial do nitrogênio

O processo de Haber-Bosch, desenvolvido na Alemanha (durante a 1ª guerra mundial) e até hoje usado pelas indústrias de fertilizantes, é o ponto inicial para a fabricação de produtos nitrogenados industriais e agrícolas.

O processo de Haber-Bosch ocorre sob elevadas temperaturas (cerca de 200 °C) e alta pressão (cerca de 200 atmosferas) e na presença de um metal catalisador (geralmente ferro). Estas condições extremas são necessárias para superar a alta energia de ativação da reação.



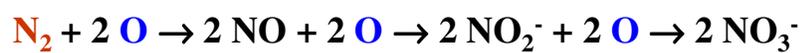
Fixação natural não biológica do nitrogênio (10%)

### ATMOSFERA:

Vapor de água, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>



Átomos de H<sup>+</sup>, O e OH<sup>-</sup>

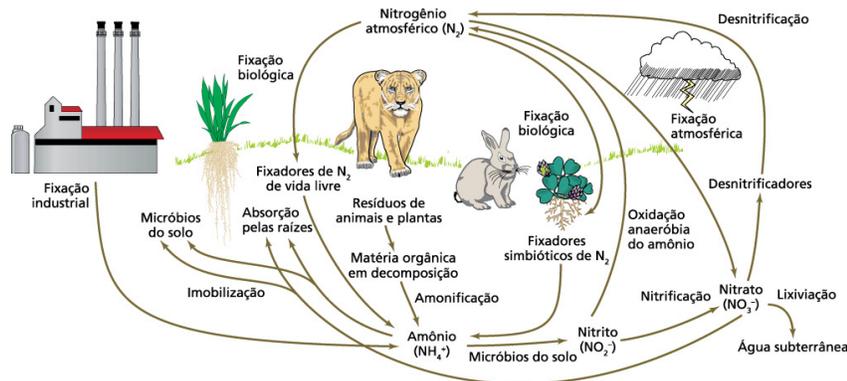


↓H<sup>+</sup> Chuva ↓H<sup>+</sup>

↓ ↓

Levados para o solo:

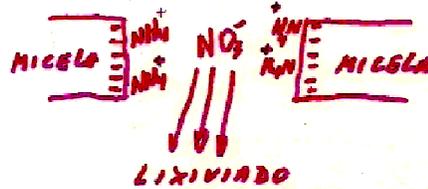
HNO<sub>2</sub> HNO<sub>3</sub>



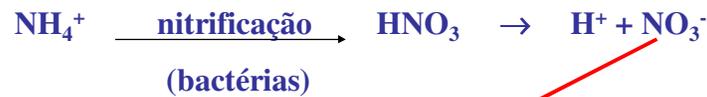
**FIGURA 12.1** O nitrogênio apresenta uma ciclagem através da atmosfera, à medida que passa da forma gasosa à de íons reduzidos, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos. Estão representadas algumas etapas envolvidas no ciclo do nitrogênio.

- **Fixação biológica: 170 milhões de ton/ano ou 100 x 10<sup>12</sup> g ano<sup>-1</sup>;**
- **Fixação elétrica: 20 milhões de ton/ano;**
- **Fixação industrial: 100 milhões de ton/ano;**
- **Volatilização da NH<sub>3</sub>: 100 milhões de ton/ano;**
- **Desnitrificação: 210 milhões de ton/ano.**

A planta absorve do solo o nitrogênio sob as formas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . O nitrogênio sob a forma de  $\text{NO}_3^-$  é facilmente lixiviado, enquanto que na forma  $\text{NH}_4^+$  não sofre lixiviação. **Por que?**



Em algumas situações:



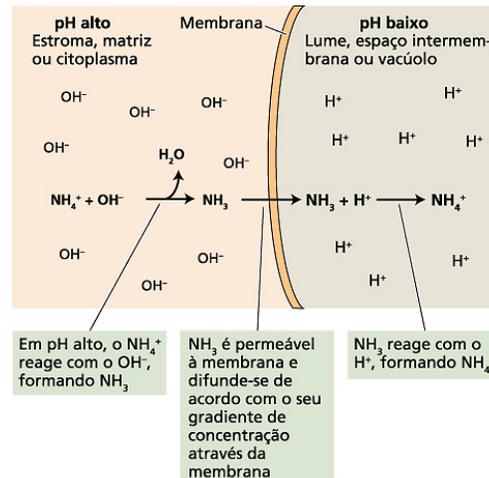
$\text{H}^+ \rightarrow$  acidifica o solo

**Lixiviado**

(não disponível para a planta)

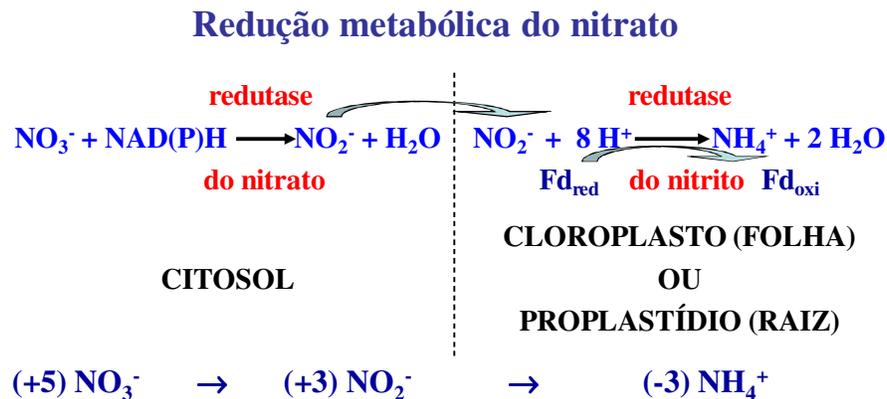
**Amônio ou nitrato não assimilados podem ser perigosos**

O amônio, se acumulado em níveis elevados nos tecidos vivos, é tóxico tanto para plantas como animais. O amônio dissipa os gradientes de prótons transmembranares necessários ao transporte de elétrons na fotossíntese e respiração, assim como na captura de metabólitos nos vacúolos.

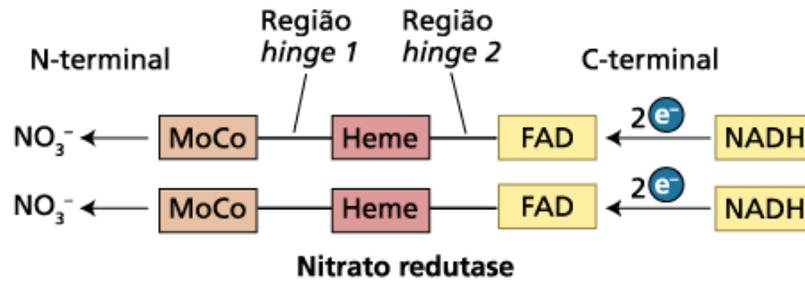


**FIGURA 12.2** A toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  pode dissipar os gradientes de pH. O lado esquerdo representa o estroma, a matriz mitocondrial ou o citoplasma, onde o pH é alto. O lado direito representa o lume, o espaço intermembrana ou o vacúolo, onde o pH é baixo; a membrana representa o tilacoide do cloroplasto, a membrana interna mitocondrial ou o tonoplasto do vacúolo de uma célula de raiz. O resultado líquido da reação mostra que as concentrações de  $\text{OH}^-$  do lado esquerdo e de  $\text{H}^+$  do lado direito diminuiram, isto é, o gradiente de pH foi dissipado (Bloom, 1997).

- As plantas podem acumular níveis altos de  $\text{NO}_3^-$  ou podem translocá-lo por meio dos tecidos sem efeitos deletérios;
- Porém, o  $\text{NO}_3^-$  em excesso, em animais e no homem, provoca uma doença chamada metemoglobinemia (transformação do  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{NO}_2^-$  no fígado, formando um complexo com a hemoglobina que impede a ligação do  $\text{O}_2$ );
- Homens e animais também convertem o  $\text{NO}_3^-$  em nitrosaminas, que são potentes carcinogênicos;
- O  $\text{NO}_2^-$  é altamente reativo e potencialmente tóxico. As células vegetais transportam rapidamente o  $\text{NO}_2^-$  do citosol para os plastídios, onde é reduzido à amônia;

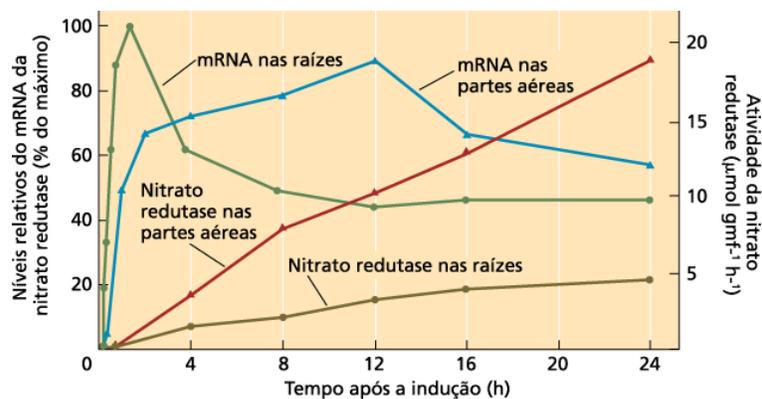


A redutase do nitrato é a principal proteína contendo molibdênio nos tecidos vegetativos; um dos sintomas de deficiência do molibdênio é o acúmulo de nitrato, resultante da diminuição da atividade da redutase do nitrato (Mendel, 2005).



**FIGURA 12.3** Modelo do dímero da nitrato redutase, indicando os três domínios de ligação cujas seqüências de polipeptídeos são similares nos eucariotos: complexo molibdênio (MoCo), grupo heme e FAD. O NADH liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), por meio de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O nitrato é reduzido no complexo molibdênio próximo à região amino terminal. As seqüências dos polipeptídeos nas regiões *hinge* são altamente variáveis entre as espécies.

### O nitrato, a luz, e os carboidratos interferem na redutase do nitrato em níveis de transcrição e tradução.



**FIGURA 12.4** A estimulação da atividade da nitrato redutase resulta da indução da síntese do mRNA desta enzima em partes aéreas e raízes de cevada; gmf, grama de massa fresca (segundo Kleinhofs et al., 1989).

## A redutase do nitrato está sujeita à modificação pós-traducional

### ATIVACÃO:

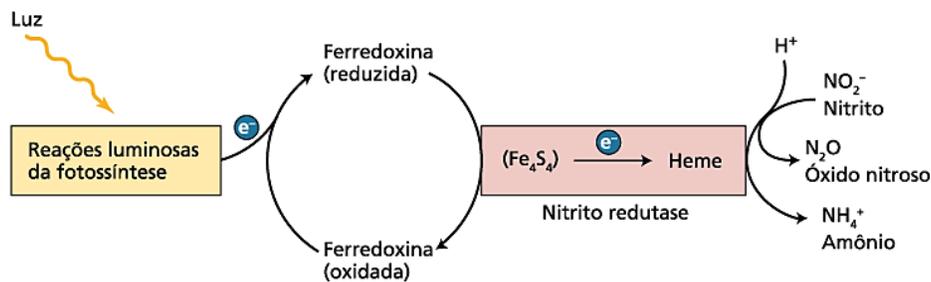
- Luz e alto teor de carboidratos estimulam a proteína fosfatase que desfosforila um resíduo de serina chave na região do *hinge 1* da redutase do nitrato, promovendo sua ativação.

### INATIVAÇÃO:

- Agindo na direção inversa, o escuro e o  $Mg^{2+}$  estimulam a proteína quinase, a qual fosforila os mesmos resíduos de serina, que depois interagem com a proteína 14-3-3 e, assim, inativam a redutase do nitrato.

*A regulação da atividade da redutase do nitrato através da desfosforilação/fosforilação possibilita um controle mais rápido do que o obtido através da síntese/degradação da enzima (minutos versus horas).*

## A redutase do nitrito converte o nitrito em amônio



**FIGURA 12.5** Modelo do acoplamento do fluxo de elétrons da fotossíntese, via ferredoxina, com a redução do nitrito pela nitrito redutase. A enzima nitrito redutase possui dois grupos prostéticos,  $Fe_4S_4$  e heme, que participam na redução do nitrito a amônio.

❖ Massa molecular de 63.000 daltons (monômero);

❖ Grupos prostéticos (2):

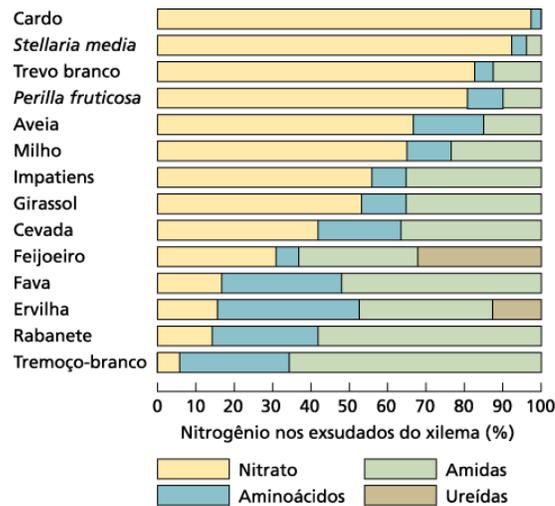
Grupo heme e o complexo protéico ( $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ).

### REAÇÃO GERAL:



- Concentrações elevadas de  $\text{NO}_3^-$  ou a exposição à luz induzem a transcrição do mRNA da redutase do nitrito. O acúmulo dos produtos finais desse processo - asparagina e glutamina – reprimem essa indução.

Raízes e partes aéreas assimilam nitrato



**FIGURA 12.6** Quantidades relativas de nitrato e outros compostos nitrogenados de exsudados do xilema de várias espécies vegetais. As plantas foram cultivadas com as suas raízes expostas a soluções de nitrato e a seiva do xilema foi coletada por rompimento do caule. Observe a presença de ureidas em feijoeiro e ervilha; somente leguminosas de origem tropical exportam nitrogênio em tais compostos (segundo Pate, 1983).

## FONTES DE N-AMONIAL EM PLANTAS

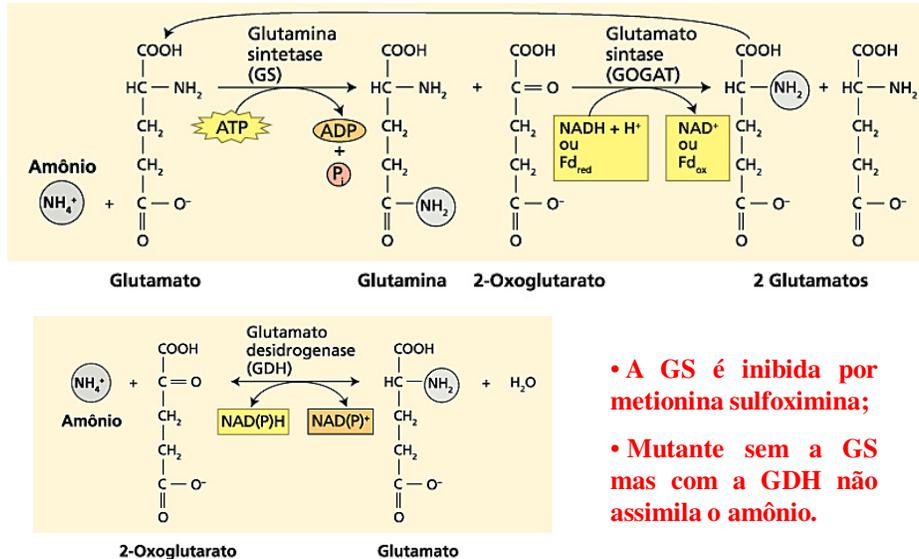
- Absorção de  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$
- **Absorção de  $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$**  ( $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ )
- Absorção de uréia:
 
$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C=O} \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{UREASE}} 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$$
- **Degradação de proteínas:**  
 proteínas  $\rightarrow$  aminoácidos  $\rightarrow$   $\alpha$ -cetoácidos +  $\text{NH}_3$
- Fotorrespiração:
 
$$2 \text{ GLICINA} \xrightarrow[\text{CO}_2]{\text{NAD}^+} \text{ SERINA} \xrightarrow[\text{NH}_3]{\text{NADH+H}^+}$$

## Assimilação do amônio

As células vegetais evitam a toxicidade do amônio pela rápida conversão do amônio, gerado a partir da assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, em aminoácidos.

**A principal rota para essa conversão envolve as ações sequenciais da sintetase da glutamina e da sintase do glutamato.**

## Estrutura e rotas de síntese de compostos envolvidas na assimilação do amônio



- A GS é inibida por metionina sulfoximina;
- Mutante sem a GS mas com a GDH não assimila o amônio.

### SINETASE DA GLUTAMINA (GS)

Duas formas: (Massa molecular: **350 kDa**)

**CITOSÓLICA:** Presente em sementes germinantes e feixes vasculares de raízes e de caules.

(função: transporte intracelular de N).

**PLASTIDIAL:** Presente em cloroplastos de folhas e plastídios de raiz.

(função: gerar N-amídico para consumo local).

Luz e teor de carboidratos alteram a expressão gênica desta forma da enzima.

## SINTASE DO GLUTAMATO (GOGAT)

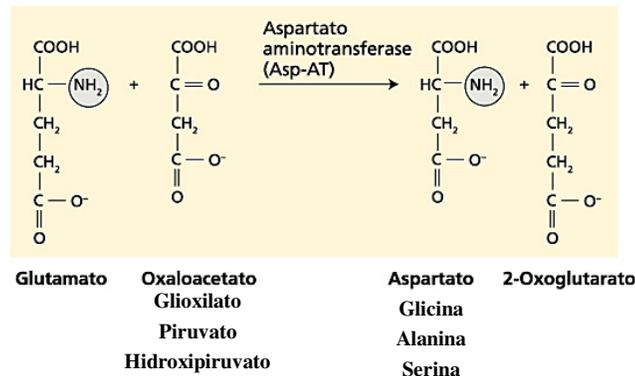
**Duas formas:**

**FERREDOXINA-GOGAT:** Presente em cloroplasto com massa molecular de 165 kDa.

(função: metabolismo do N na fotorrespiração).

A quantidade e a atividade desta forma aumentam com o nível de luz.

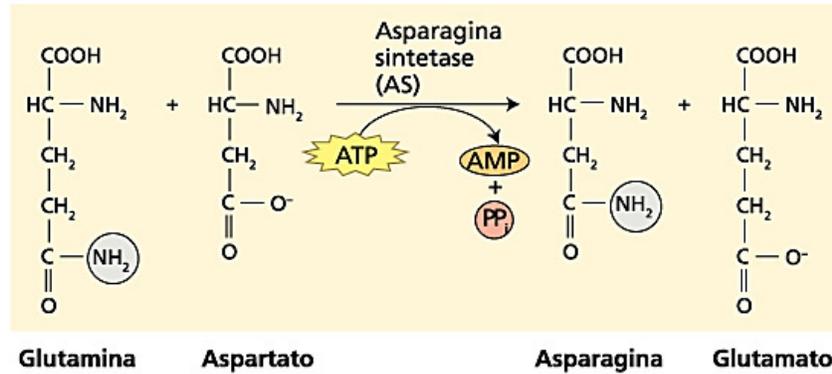
**NADH-GOGAT:** Presente em plastídio de tecidos não fotossintéticos da raiz (função: assimilação de  $\text{NH}_4^+$  absorvido pela raiz) e em feixes vasculares de folhas em desenvolvimento (função: assimilação de glutamina transportada das raízes ou de folhas senescentes).



**Localização:** Citosol, plastídios, mitocôndrias, peroxisomos e glioxissomos.

**As aminotransferases de cloroplasto tem papel importante na síntese de vários aminoácidos (glutamato, aspartato, alanina, serina e glicina).**

## Outra importante enzima é sintetase da asparagina (AS):

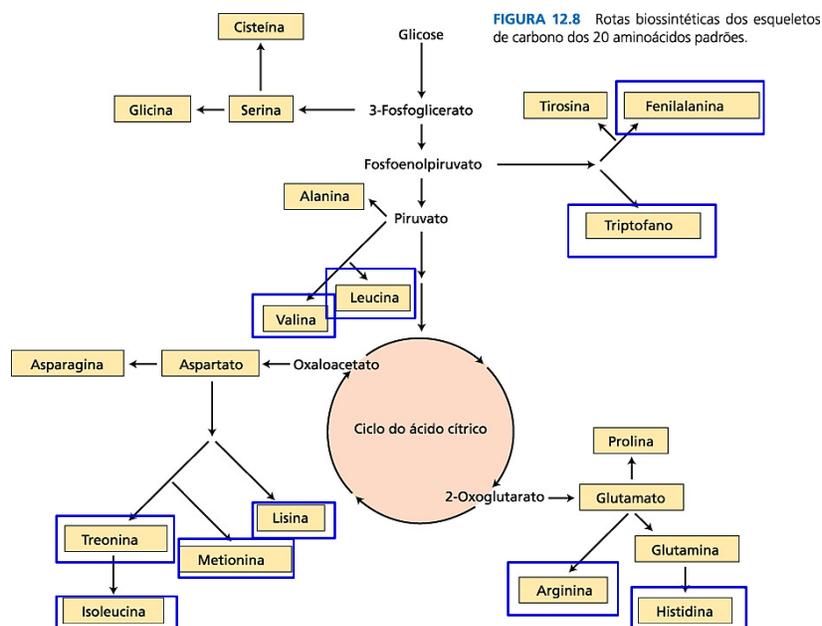


## A asparagina e a glutamina unem o metabolismo do carbono e do nitrogênio

- **Altos níveis de luz e de carboidratos** – condições que estimulam a GS e a Fd-GOGAT dos plastídios – inibem a expressão dos genes que codificam a sintetase da asparagina (AS) e a sua atividade.
- A regulação antagônica destas rotas competitivas auxilia no balanço do metabolismo do carbono e do nitrogênio nos vegetais (Lam *et al.*, 1996).

- As condições de alta energia estimulam a GS e a GOGAT e **inibem a AS**, favorecendo a assimilação do nitrogênio em glutamina e em glutamato, compostos ricos em carbono e que participam da síntese de novos materiais vegetais;
- Por outro lado, as condições limitadas de energia **inibem a GS e a GOGAT**, estimulam a AS, favorecendo a assimilação do nitrogênio em asparagina, um composto rico em nitrogênio e suficientemente estável para ser transportado em longas distâncias e armazenado por muito tempo.

## Biossíntese de aminoácidos

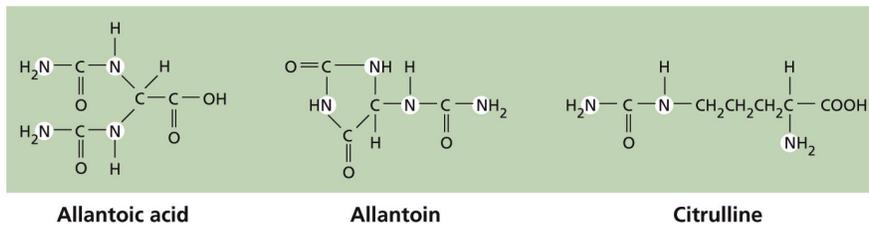


As plantas fixadoras de nitrogênio assimilam o N-amoniaco nas raízes formando amidas ou ureídeos, antes de transportá-lo para a parte aérea.

**Baseando-se na composição química do xilema destas plantas, pode-se dividi-las em 2 grupos:**

- 1. Exportadoras de amidas** (Asparagina, 2N:4C e glutamina, 2N:5C), **que são as leguminosas de regiões temperadas: Trevo, *Vicia faba*, alfafa, lupino e lentilha;**
- 2. Exportadoras de ureídeos** (Alantoína, 4N:4C, ácido alantóico, 4N:4C e citrulina, 3N:6C), **que são as leguminosas de origem tropical: *Phaseolus*, soja, amendoim e feijão-de-corda.**

### Relação C:N nos principais compostos nitrogenados transportados pelo xilema



- **Glutamato: 5C:1N;      Glutamina: 5C:2N;**
- **Aspartato: 4C:1N;      Asparagina: 4C:2N;**
- **Alantoína: 4C:4N** (Sintetizada no peroxissomo);
- **Ácido alantóico: 4C:4N** (Sintetizado no retículo endoplasmático);
- **Citrulina: 6C:3N** (Local de síntese desconhecido).

## Efeitos da assimilação do nitrogênio na utilização de carboidratos (uso de fertilizantes nitrogenados):

N aplicado em grandes quantidades → causa **redução no nível de carboidratos** nas plantas.

Suspensão da aplicação de N → o nível de **carboidratos aumenta**.

### Por que isto acontece?

1. Excesso de N → **há consumo excessivo de  $\alpha$ -cetoácidos** → aumento da atividade respiratória → **aumento no consumo de carboidratos**.
2. Na redução de  $\text{NO}_3^-$  →  $\text{NH}_3$  a planta **gasta poder redutor**, que é fornecido pela FS (diminuição) ou RS (aumento), **acarretando diminuição no teor de carboidratos**.
3. Na assimilação da  $\text{NH}_3$  a planta **gasta poder redutor e ATP**, que são fornecidos pela FS (diminuição) ou RS (aumento), **acarretando, também, diminuição no teor de carboidratos**.

### Que importância prática têm estes fatos?

- AIPO (porção comestível: haste). **O aipo será de boa qualidade quando a haste tiver paredes celulares bem delgadas. Portanto, usa-se excesso de nitrogênio → diminuição da quantidade de carboidratos → menos celulose → parede celular mais delgada → hastes de boa qualidade (tenras).**

- **BETERRABA AÇUCAREIRA**

Plantio → 6 meses → colheita

**Deve-se suspender a aplicação de nitrogênio, pelo menos 1 a 2 meses antes da colheita.**

No início, a aplicação de N favorece o crescimento da parte aérea em detrimento da raiz;

Nos últimos dois meses, a suspensão da aplicação de N, favorece a translocação de carboidratos para a raiz.

## Qual a melhor forma de aplicar N?

Sob a forma de  $\text{NO}_3^-$  ou de  $\text{NH}_4^+$ ?

- **Condições da planta:**
  - Condições ambientais que conduzem a alta atividade fotossintética → pode-se aplicar N como  $\text{NH}_4^+$ ;
  - Condições ambientais que conduzem a baixa atividade fotossintética → não se deve aplicar N como  $\text{NH}_4^+$  → Problemas de toxicidade de  $\text{NH}_4^+$ .
  
- **Condições do solo:**
  - Aplicação de  $\text{NH}_4^+$  ao solo pode haver a presença de bactérias nitrificadoras\* e causar a acidez do solo.  

$$\text{NH}_4^+ \xrightarrow{*} \text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$$
  
- **Custo de adubação:**
  - Amônia anidra é mais barata do que  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

## Fixação natural biológica do nitrogênio:

- **Fixadores de nitrogênio de vida livre**
  
- **Fixação simbiótica do nitrogênio**

## Exemplos de organismos que podem realizar a fixação do nitrogênio

## Fixação simbiótica do nitrogênio

Planta hospedeira	Simbiontes fixadores de N
Leguminosas e <i>Parasponia</i>	<i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Photorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i>
Actinorrízicas: <i>Alnus</i> (árvore), <i>Ceanothus</i> (arbusto), <i>Casuarina</i> (árvore), <i>Datisca</i> (arbusto)	<i>Frankia</i>
<i>Gunnera</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Azolla</i> (pteridófito aquática)	<i>Anabaena</i>
Cana-de-açúcar	<i>Acetobacter</i>

## Fixadores de nitrogênio de vida livre

Tipo	Gêneros fixadores de N
Cianobactérias (algas azuis-esverdeadas)	<i>Anabaena</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Nostoc</i>
Outras bactérias	
Aeróbias	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Dexia</i>
Facultativas	<i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Anaeróbias	
Não-fotossintetizantes	<i>Clostridium</i> , <i>Methanococcus</i> (Arqueobactéria)
Fotossintetizantes	<i>Chromatium</i> , <i>Rhodospirillum</i>

Equação geral da fixação do N (Nitrogenase é inativada por O<sub>2</sub>)

## Fixador de nitrogênio de vida livre



**FIGURA 12.10** Um filamento de cianobactéria fixadora de nitrogênio (*Anabaena*) com um heterocisto. Os heterocistos com paredes espessas, intercalados entre as células vegetativas, têm um ambiente interno anaeróbio que permite à cianobactéria fixar nitrogênio em condições aeróbias (© Dr. Peter Silver/Visuals Unlimited/Alamy).

## Fixador de nitrogênio de vida livre

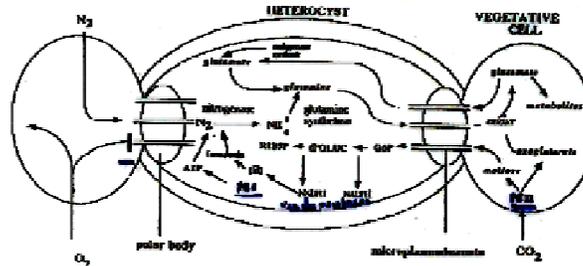


Figure 7.6 Diagrammatic representation of carbon and nitrogen exchange between the heterocyst and vegetative cells. Carbon compounds are transported from the vegetative cells into the nitrogen fixing heterocyst in order to supply the necessary NADPH via the oxidative pentose pathway. The ammonia produced by nitrogen fixation is assimilated by glutamine synthetase and the majority of glutamine transported to the vegetative cell where it is converted into glutamate by glutamate synthase (GOGAT). The heterocyst and vegetative cell thus demonstrate an early evolved form of cellular specialization (Smith & Callow, 1993).

**Obs: A associação *Azolla-Anabaena* pode fixar 0,5 kg de  $N_2$  hectare<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, uma taxa de fertilização suficiente para manter uma lavoura mediana de arroz.**

### Associações entre plantas hospedeiras e rizóbios

Planta hospedeira	Rizóbios simbiotes
<i>Parasponia</i> (não-leguminosa, antigamente chamada de Tremas)	<i>Bradyrhizobium</i> spp.
Soja ( <i>Glycine max</i> )	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (com crescimento lento); <i>Sinorhizobium fredii</i> (com crescimento rápido)
Alfafa ( <i>Medicago sativa</i> )	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Sesbania</i> (leguminosa)	<i>Azorhizobium</i> (forma nódulos nas raízes e no caule; no caule se desenvolvem raízes adventícias)
Feijão ( <i>Phaseolus</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> ; <i>Rhizobium tropici</i> ;
Trevo ( <i>Trifolium</i> )	<i>Rhizobium etli</i>
Ervilha ( <i>Pisum sativum</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv.
<i>Aeschynomene</i> (leguminosa)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> <i>Photorhizobium</i> (rizóbios fotossinteticamente ativos, que formam nódulos no caule, provavelmente associados a raízes adventícias)

### Equação geral da Nitrogenase (inativada por $O_2$ )



**Nódulos de  
infecção em  
raízes do  
feijoeiro  
(*Phaseolus  
vulgaris*).**



**FIGURA 12.9** Nódulos em raiz do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Os nódulos são o resultado da infecção por *Rhizobium* sp. (Fotografia de David McIntyre).

**Nódulos de infecção em raízes de soja**



**FIGURE 12.8** Root nodules on soybean. The nodules are a result of infection by *Rhizobium japonicum*. (© Wally Eberhart/Visuals Unlimited.)

## Fixação simbiótica do nitrogênio

Do ponto de vista agrícola, o sistema mais importante é o da associação *Rhizobium* – raiz de leguminosa (nódulos).

Neste tipo de associação, a leguminosa fornece carboidratos para a bactéria, **que quando oxidados produzem os elétrons necessários para a redução do N<sub>2</sub>**, em troca, a bactéria fornece à leguminosa o nitrogênio fixado (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

A simbiose entre uma leguminosa e a bactéria não é obrigatória. Porém, sob condições de limitação de N, os simbiossitos se atraem mutuamente, através de um elaborado sistema de sinais:

O estágio inicial na formação da simbiose é a migração da bactéria em direção à planta hospedeira.

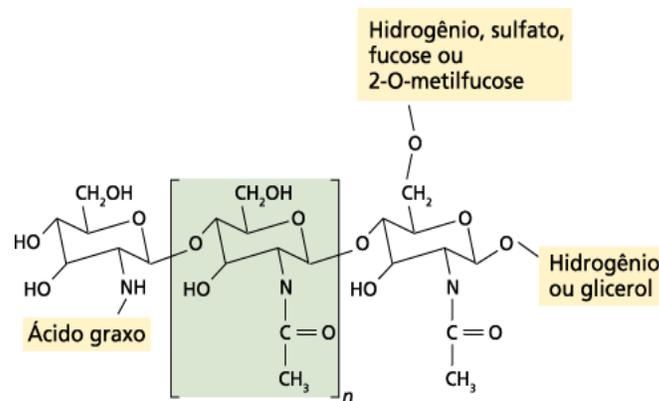
**Esta migração é uma resposta quimiotática mediada por atraentes químicos, (iso)flavonóides e betáinas, secretados pelas raízes da planta.**

A sinalização, o processo de infecção e o desenvolvimento dos nódulos envolvem genes específicos da planta hospedeira e da bactéria infectante.

As bactérias produzem os fatores de nodulação, que atuam como sinalizadores para a iniciação da simbiose. Estes fatores de iniciação são moléculas de lipoquitina (oligossacarídeos sinalizadores).

Nas raízes das plantas hospedeiras são produzidas lectinas específicas que reconhecem a lipoquitina específica direcionando, o *Rhizobium* apropriado para a infecção daquele hospedeiro, facilitando sua ligação com a parede celular dos pelos radiculares.

Dois processos, infecção e organogênese do nódulo, ocorrem simultaneamente:



**FIGURA 12.11** Os fatores Nod são oligossacarídeos de lipoquitina. A cadeia de ácido graxo apresenta normalmente de 16 a 18 carbonos. O número de sessões intermediárias repetidas (n) é geralmente dois a três (de Stokkermans et al., 1995).

## Os fatores Nod produzidos pela bactéria atuam como sinalizadores para a simbiose

Planta (genes *Nod*) → Genes nodulinos;

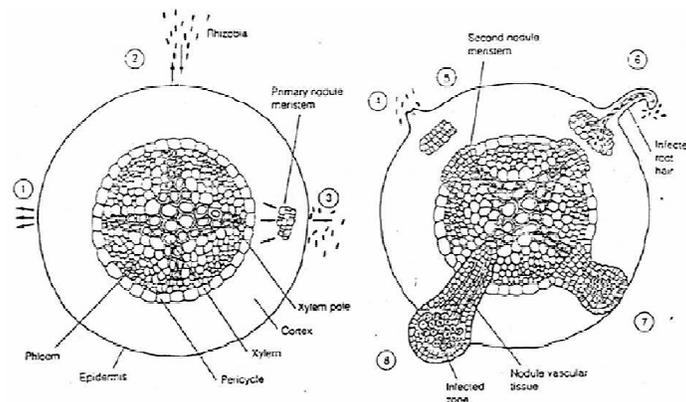
Rhizóbio (genes *nod*) → Genes de nodulação;

*nodD* (constitutivo) → Gene promotor (regulador);

*nodA*, *nodB* e *nodC* (indutivos) → Genes comuns:

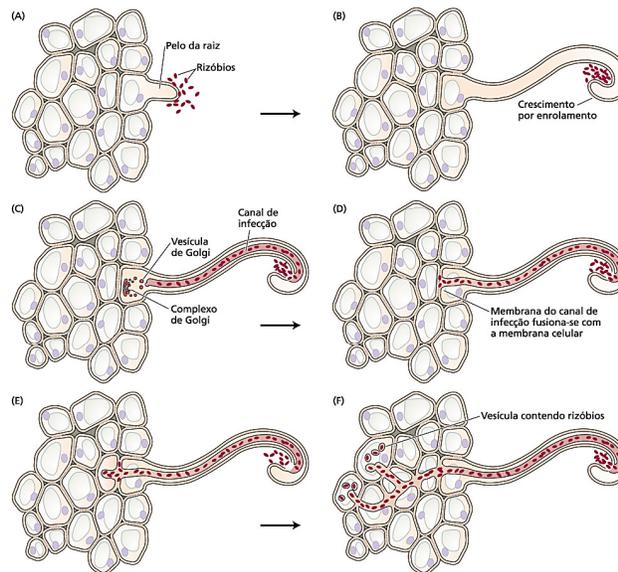
- NodA → N-acetiltransferase, adiciona ácidos graxos;
- NodB → Dessacetilase do oligossacarídeo de quitina, remove o acetil de um açúcar terminal não redutor;
- NodC → Síntase do oligossacarídeo de quitina, adiciona N-acetil-glucosamina;

*nodE*, *nodF*, *nodH*, *nodL*, *nodP* e *nodQ* (indutivos) → Genes específicos (diferem entre as espécies de rizóbios e determinam a faixa de hospedeiros, as plantas que podem ser infectadas).



1. As plantas secretam atraentes químicos: Flavonóides, (iso)flavonóides, homoserina (aleloquímicos);
2. As bactérias produzem fatores de nodulação (lipoquitinas) e liberam sinais mitogênicos que induzem a divisão celular nas plantas (formação do primórdio nodular);
3. Os receptores das leguminosas para os fatores de nodulação parecem ser lectinas específicas.

## Processo de infecção durante a organogênese do nódulo



**FIGURA 12.12** O processo de infecção durante a organogênese do nódulo. (A) Os rizóbios ligam-se a um pelo emergente da raiz, em resposta a atrativos químicos liberados pela planta. (B) Em resposta aos fatores produzidos pelas bactérias, o pelo da raiz exibe um enrolamento anormal e as células dos rizóbios crescem dentro dos enrolamentos. (C) A degradação localizada da parede celular do pelo da raiz leva à infecção e à formação do canal de infecção a partir das vesículas secretoras do Golgi das células da raiz. (D) O

canal de infecção atinge a extremidade da célula e sua membrana funde-se com a membrana plasmática da célula do pelo da raiz. (E) Os rizóbios são liberados no apoplasto e penetram no complexo da lamela média para a membrana plasmática da célula subepidérmica, iniciando um novo canal de infecção, o qual forma um canal aberto com o primeiro. (F) O canal de infecção estende-se e ramifica-se até atingir as células-alvo, onde as vesículas compostas de membranas vegetais que envolvem células bacterianas são liberadas no citosol.

### Diferentes compostos de sinalização, atuando positiva ou negativamente, controlam a posição do primórdio nodular:

- Um nucleosídeo de uridina difunde-se do estelo para o córtex na zona do protoxilema e estimula a divisão celular;
- O etileno, sintetizado na região do periciclo, difunde-se para o córtex e bloqueia a divisão celular no pólo oposto ao floema da raiz.

**Obs:** Em algumas leguminosas de clima temperado (ervilha) os nódulos são alongados e cilíndricos pela presença de um meristema nodular. Já, em soja e amendoim eles são esféricos e não tem um meristema.

Neste tipo de associação a  $[O_2]$  é reduzida pela alta taxa de respiração dos simbiontes como também, pela presença da leg-hemoglobina **que é sintetizada pela planta em resposta à infecção** (Buchanan *et al.*, 2000).

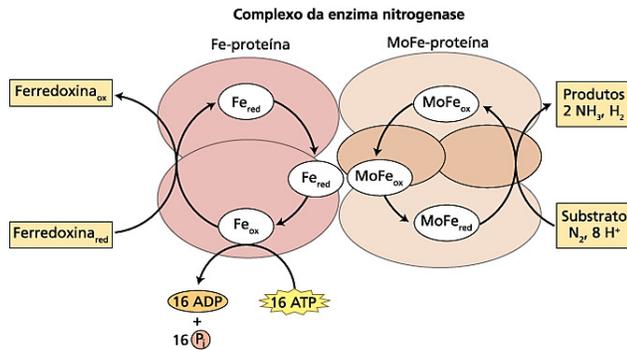
Esta proteína está presente nas células do nódulo em altas concentrações (700  $\mu M$ ) e é responsável pela coloração rosada dos nódulos.

Quanto maior for a concentração de leg-hemoglobina ( $K_m = 0,01 \mu M$  de  $O_2$ ) maior será a fixação de  $N_2$ .

A leg-hemoglobina tem a função de transportar  $O_2$  para a respiração dos bacteróides (organelas endossimbióticas).

O bacteróide utiliza uma CTE especializada, na qual a oxidase terminal possui afinidade pelo  $O_2$  muito elevada ( $K_m = 7 \text{ nM}$ ). A citocromo oxidase de mitocôndria de plantas tem  $K_m = 1 \mu M$ .

## O complexo da enzima nitrogenase fixa o N<sub>2</sub>



**FIGURA 12.13** Reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoque uma mudança na conformação desta proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe-proteína e esta última reduz o N<sub>2</sub> (segundo Dixon e Wheeler, 1986; Buchanan et al., 2000).



$$\Delta G^0 = -200 \text{ kJ mol}^{-1}$$

### CARACTERÍSTICAS DA NITROGENASE

**Constituída por duas proteínas (20% das proteínas do bacteróide - 5 N<sub>2</sub> reduzidos por segundo):**

1. **Fe-proteína:**
  - Massa molecular: 30 – 72 kDa;
  - 2 sub-unidades protéicas;
  - 4 átomos de Fe-S (Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>);
  - **Irreversivelmente inativada por O<sub>2</sub> (meia-vida de 30 a 45 s) ;**
  
2. **MoFe-proteína:**
  - Massa molecular: 180 – 235 kDa;
  - 4 sub-unidades protéicas;
  - 28 átomos de Fe-S e 2 átomos de Mo;
  - **Também inativada por O<sub>2</sub> (meia-vida de 10 minutos no ar)**

**TABLE 12.4**  
Reactions catalyzed by nitrogenase

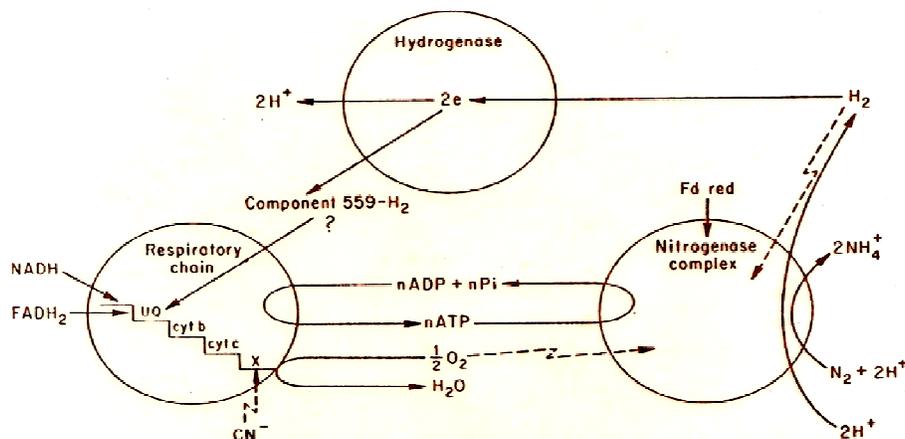
$N_2 \rightarrow NH_3$ †	Molecular nitrogen fixation
$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$	Nitrous oxide reduction
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Azide reduction
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Acetylene reduction
$2 H^+ \rightarrow H_2$ †	$H_2$ production
$ATP \rightarrow ADP + P_i$ †	ATP hydrolytic activity

Source: After Burris 1976.

**Sob condições naturais, quantidades substanciais de  $H^+$  são reduzidas ao gás  $H_2$ .**

**Nos rizóbios, 30 a 60% da energia fornecida para a nitrogenase podem ser perdidos como  $H_2$ , diminuindo a eficiência da fixação do nitrogênio.**

**Alguns rizóbios tem uma hidrogenase que cliva o  $H_2$  e gera elétrons para a fixação do nitrogênio.**



**Figure 2** A generalized scheme illustrating possible interrelationships during nitrogen fixation, hydrogen uptake, and respiratory electron transport in *Rhizobium japonicum*. Inhibition is indicated by dashed lines. There are indications that component 559- $H_2$  may act as an electron carrier between hydrogenase and the electron transport chain (67, 68).

## O alto custo da adubação nitrogenada tem incentivado pesquisas em:

- Identificação dos fatores que afetam a fixação simbiótica;
- Identificação de espécies capazes de fixar o  $N_2$ ;
- Transferir a capacidade de fixar  $N_2$  para as plantas que não a possuem;
- Aumentar a eficiência da fixação nas plantas fixadoras:
  - ❖ Identificação ou seleção de linhagens ou raças de *Rhizobium* mais eficientes;
  - ❖ Seleção de hospedeiros mais compatíveis com as raças de *Rhizobium* existentes.
- Produção de nitrogenase em *E. coli* e posterior introdução da enzima e demais componentes do sistema de fixação em plantas não fixadoras.

Ocorre inibição da fixação simbiótica do  $N_2$  pelo uso de fertilizantes nitrogenados ( $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ ).

### PORQUE CAUSA:

- Inibição da ligação do *Rhizobium* com o pelo radicular;
- Aborto do filamento de infecção;
- Diminuição do crescimento do nódulo;
- Inibição da fixação do  $N_2$  nos nódulos já estabelecidos;
- Aceleração da senescência dos nódulos.

## Transformações do N durante o desenvolvimento

Semente (N – protéico) → Germinação → degradação de proteína–fitina pelas enzimas fitase, proteases e peptidases → produzindo aminoácidos e liberando cátions e fósforo ligados à fitina nos corpos protéicos → transporte destes para o eixo embrionário → Ocorrendo o desenvolvimento da plântula pela utilização de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , cátions e fósforo.

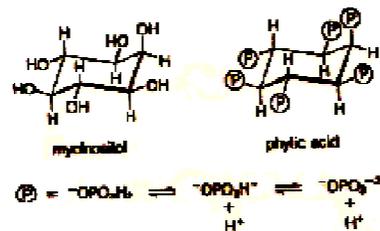


Figure 10-10 Structures of myoinositol (left) and its hexaphosphate, phytic acid.

## Teor de nutrientes minerais na fitina em sementes de plantas (% da massa seca)

Espécie	Mg	Ca	K	P	Fe	Mn	Cu
Aveia	0,40	0,19	1,10	0,96	0,035	0,008	0,005
Soja	0,22	0,13	2,18	0,71	---	---	---
Algodão	0,40	0,13	2,18	0,79	0,059	0,003	0,005
Cevada	0,16	0,03	0,56	0,043	---	---	---
Girassol	0,40	0,20	1,00	1,01	---	---	---

(Bewley & Black, 1994)

Variações no teor de nitrogênio de vários órgãos durante o desenvolvimento de sementes de plantas do feijão fava (*Vicia faba*).

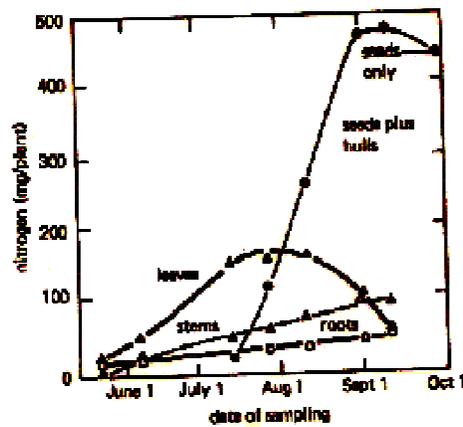


Figure 13-11 Changes in nitrogen content of various organs of the broad bean (*Vicia faba*) during growth. The extensive accumulation of nitrogen compounds in the fruits (seeds plus hulls) was accompanied by a loss from the leaves and a large uptake from the soil. (Data of A. Emmerring, 1890. *Lectw. Biochemizität* 24:113.)

Variações no teor de nitrogênio de vários órgãos durante o desenvolvimento de sementes de plantas de trigo.

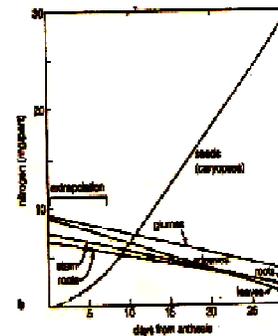
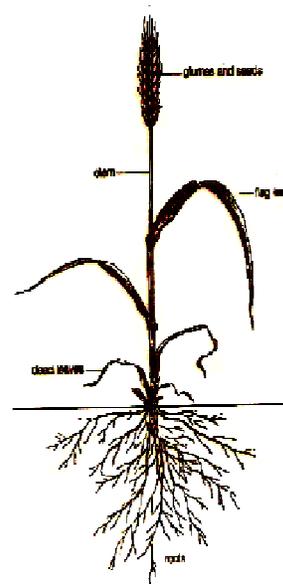


Figure 13-12 Changes in nitrogen content of various organs during seed development in a wheat plant. Measurements were made beginning about 8 days after anthesis and continuing until day 25 when seeds were mature. Drying of plant was made 15 days after anthesis and 80% of plants analyzed for total nitrogen. On day 15, glumes and flag leaf were dead; the leaf just below the flag leaf was half yellow-brown; the second leaf below the flag leaf was half yellow-brown and other leaves were dead. (From R.J. Simpson et al., 1989. Used by permission.)

## Assimilação de enxofre

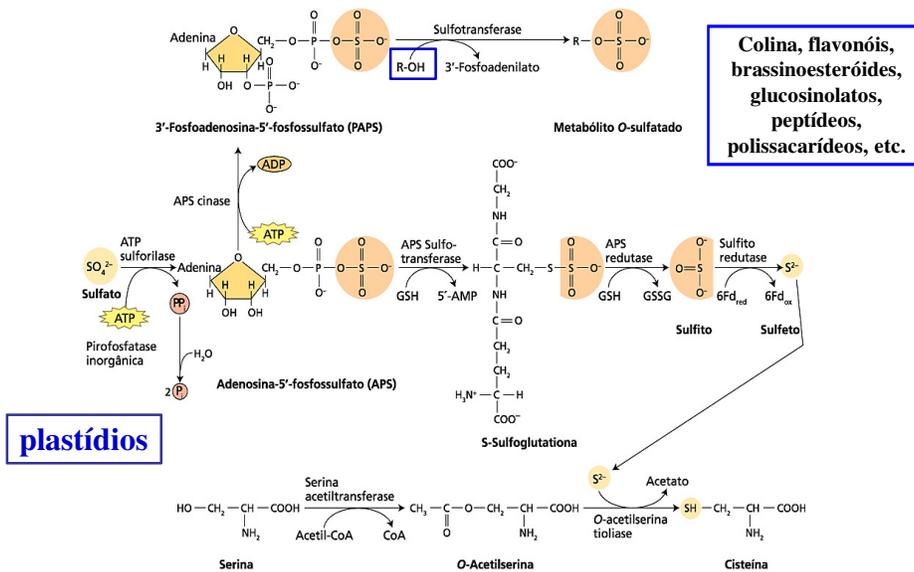
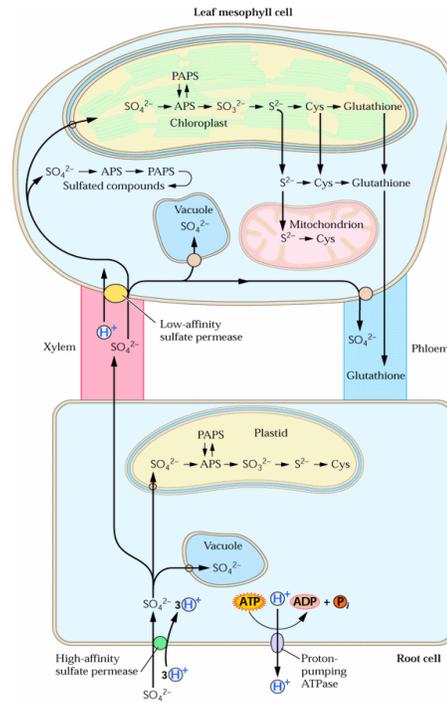
As plantas obtêm o enxofre principalmente à custa do  $\text{SO}_4^{2-}$  (através do simporte  $\text{H}^+\text{-SO}_4^{2-}$ ) existente no solo.

A maioria provém da decomposição das rochas. Outra parte é obtida de  $\text{SO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$  (queima de combustíveis fósseis, indústrias e veículos automotores) que se transformam em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e através da chuva ácida é levado para o solo.

As plantas podem absorver  $\text{SO}_2$  através dos estômatos e transformá-lo em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Porém,  $[\text{SO}_2]$  acima de 0,3 ppm por mais de 8 horas causa danos às folhas.

O enxofre, assim como o N, é um dos mais versáteis elementos encontrados nos organismos vivos devido aos seus múltiplos estados estáveis de oxidação.

## Visão geral da absorção, redução e transporte de enxofre em plantas.



**FIGURA 12.15** Estrutura e rotas metabólicas dos compostos envolvidos na assimilação do enxofre. A enzima ATP sulfotransferase cliva o pirofosfato do ATP e o substitui com o sulfato. O sulfeto é produzido a partir do APS por reações que envolvem a redução pela glutatona e ferredoxina. O sulfeto reage com a O-acetilserina, formando cisteína. Fd, ferredoxina; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada.

## ASSIMILAÇÃO DO ENXOFRE

## ASSIMILAÇÃO DE FOSFATO

O fosfato ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ) na solução do solo é rapidamente absorvido pelas raízes por intermédio de um transportador de  $\text{H}^+\text{-HPO}_4^{-2}$  do tipo simporte e incorporado em uma variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares fosfato, fosfolipídios e nucleotídeos.

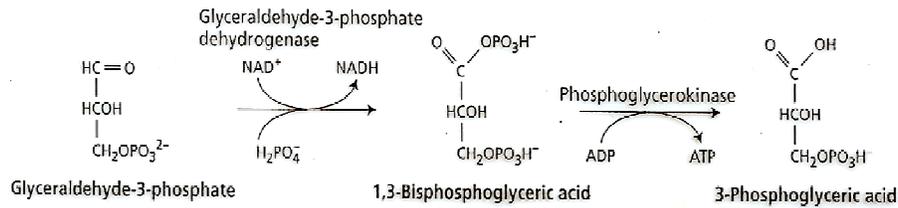


Figure 12.15 Substrate-level phosphorylation. In this reaction, which occurs in glycolysis, inorganic phosphate is incorporated into 1,3-bisphosphoglyceric acid (first reaction), and this compound is broken down to produce ATP from ADP (second reaction).

## ASSIMILAÇÃO DE CÁTIONS

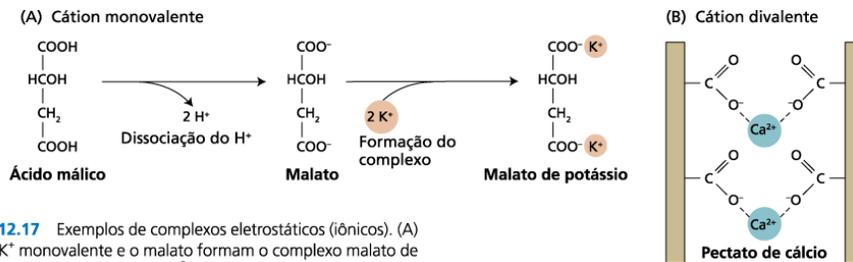
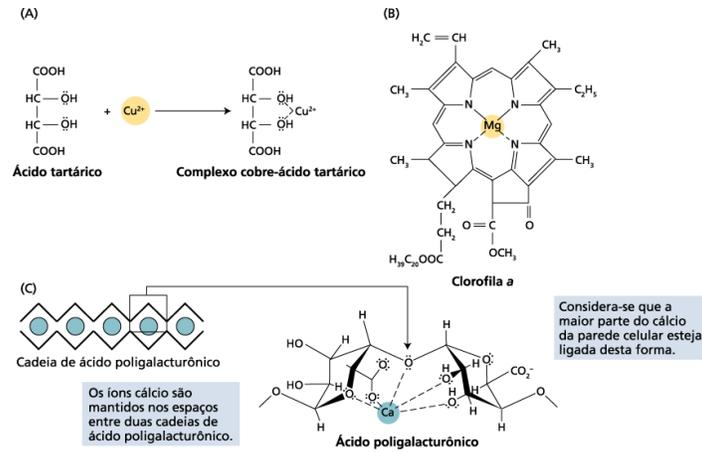


FIGURA 12.17 Exemplos de complexos eletrostáticos (iônicos). (A) O cátion  $\text{K}^+$  monovalente e o malato formam o complexo malato de potássio. (B) O cátion divalente  $\text{Ca}^{2+}$  e o pectato formam o complexo pectato de cálcio. Os cátions divalentes podem formar ligações cruzadas entre as bordas paralelas que possuem grupos carboxila negativamente carregados. As ligações cruzadas do cálcio exercem um papel estrutural nas paredes celulares.

### Ligações eletrostáticas

## Ligações de valência coordenada

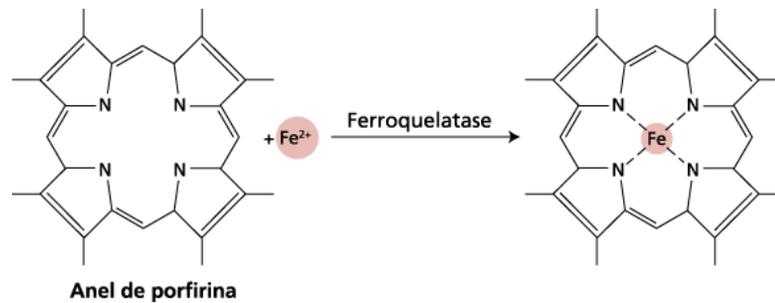


**FIGURA 12.16** Exemplos de complexos de valência coordenada. Os complexos de valência coordenada são formados quando os átomos de oxigênio ou nitrogênio, de um composto de carbono, doam pares de elétrons não compartilhados (representados por pontos) para formar uma ligação com o cátion. (A) Íons cobre compartilham elétrons com os oxigênios das hidroxilas do ácido tartárico. (B) Íons magnésio compartilham elétrons com os átomos de nitrogênio da clorofila a. As linhas tracejadas representam as ligações de valência coordenada entre elétrons não compartilhados dos átomos de nitrogênio e do cátion magnésio. (C) Modelo de "caixa de ovos" da interação do ácido poligalacturônico, o principal constituinte das pectinas nas paredes celulares, e os íons cálcio. À direita está representada, de forma aumentada, a formação de um complexo de valência coordenada entre um único íon cálcio com os oxigênios das hidroxilas dos resíduos do ácido galacturônico (segundo Rees, 1977).

## As raízes modificam a rizosfera para absorver o ferro

- O ferro é importante nas proteínas Fe-S, grupos heme (reação catalisada pela ferroquelatase), fitoferritina (complexo protéico com 24 unidades idênticas, 480 kDa, e um núcleo com 5.400 a 6.200 átomos de Fe) e como catalisador de enzimas das reações redox;
- As plantas obtêm o ferro do solo como  $\text{Fe}^{3+}$  em óxidos como o  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  e  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ . Em pH neutro o ferro é altamente insolúvel;

## Reação da ferroquelatase

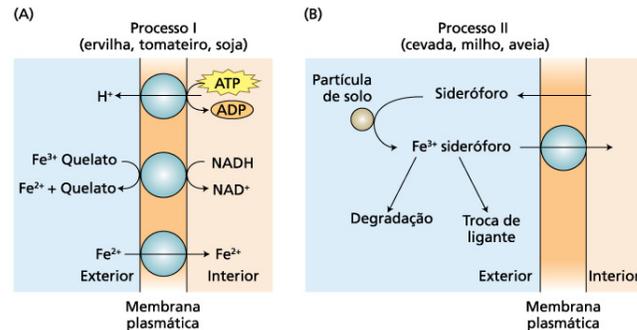


**FIGURA 12.19** Reação da ferroquelatase. A enzima ferroquelatase catalisa a inserção do ferro no anel da porfirina, formando o complexo de valência coordenada. Ver Figura 7.36 para ilustração da biossíntese do anel da porfirina.

- **As raízes desenvolvem alguns mecanismos para aumentar a solubilidade e a disponibilidade do ferro para as plantas:**
  - **Aumenta a solubilidade do ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pela acidificação do solo ao seu redor (liberam  $\text{H}^+$  e ácidos orgânicos: málico e cítrico);**
  - **Redução do ferro férrico à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mais solúvel (membrana plasmática de raiz possui a enzima redutase ferro-quelante que usa NADH ou NADPH como doadores de elétrons. A atividade desta enzima aumenta sob condições de deficiência de ferro);**

## Dois processos pelos quais as raízes absorvem o ferro

**FIGURA 12.18** Dois processos pelos quais as plantas absorvem o ferro. (A) Processo comum nas dicotiledôneas como ervilha, tomateiro e soja. Os quelatos incluem compostos orgânicos como ácido málico, ácido cítrico, fenóis e ácido piscídico. (B) Um processo comum nas gramíneas como cevada, milho e aveia. Após a excreção do sideróforo pela gramínea e a retirada do ferro de partículas do solo, o complexo pode ser degradado e liberar o ferro para o solo, trocar o ferro por outro ligante ou ser transportado para o interior da raiz (segundo Guerinot e Yi, 1994).



- **Liberação de compostos que formam complexos estáveis e solúveis com o ferro. Vários compostos secretados pelas raízes formam quelatos estáveis com o ferro (ácido málico, ácido cítrico, fenólicos e o ácido piscídico).**
- **As gramíneas produzem uma classe especial de aminoácidos quelantes do ferro denominados de fitosideróforos (ácido muginéico).**

## ASSIMILAÇÃO DO OXIGÊNIO

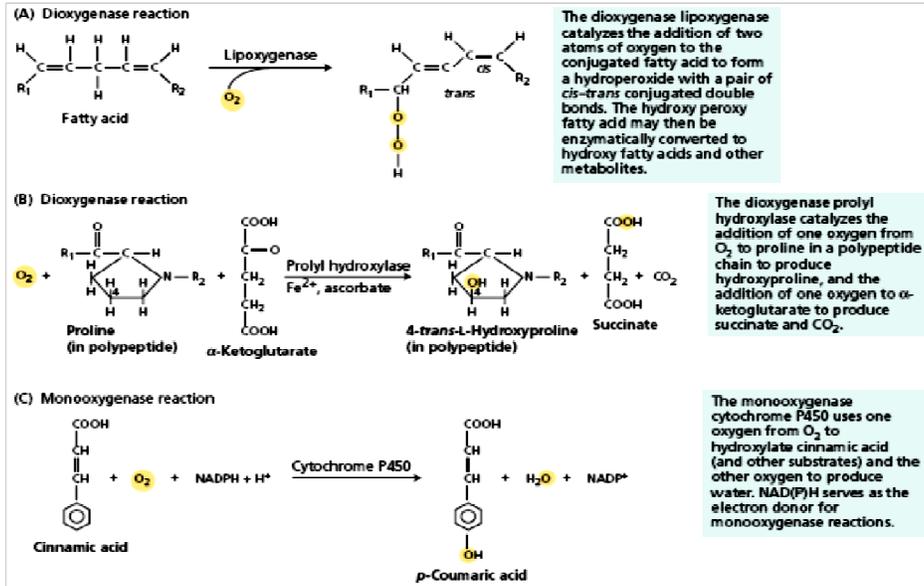


FIGURE 12.18 Examples of the two types of oxygenase reactions in cells of higher plants.

## Processos envolvidos na assimilação do nitrogênio mineral nas folhas.

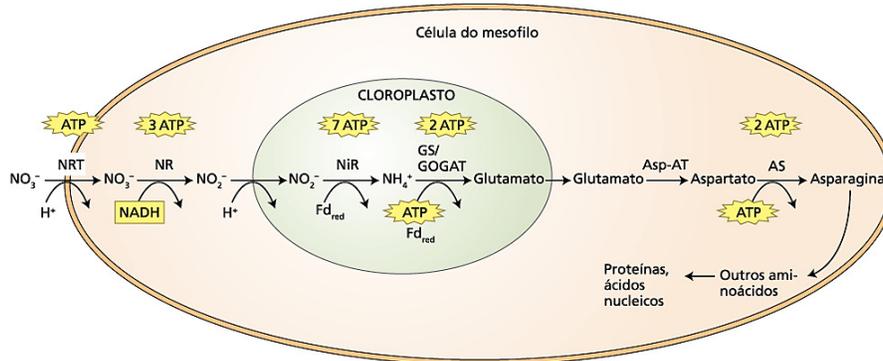


FIGURA 12.20 Resumo dos processos envolvidos na assimilação do nitrogênio mineral na folha. O nitrato translocado das raízes pelo xilema é absorvido por uma célula do mesófilo por um dos transportadores de nitrato-próton (NRT) do tipo simporte para o citoplasma. O nitrato é, então, reduzido a nitrito via nitrato redutase (NR). O nitrito é translocado para o estroma do cloroplasto junto com um próton. No estroma, o nitrito é reduzido a amônio, via ni-

trito redutase (NIR) e esse amônio é convertido em glutamato pela ação sequencial da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT). Novamente no citoplasma, o glutamato é transaminado a aspartato, via aspartato aminotransferase (Asp-AT). Finalmente, a asparagina sintetase (AS) converte o aspartato em asparagina. As quantidades aproximadas de ATP equivalente para cada reação estão indicadas acima.

**Visão geral da  
absorção de N em  
plantas não  
noduladas e  
plantas  
noduladas com  
simbiontes de  
fixação do N.**

