Acquisizione e assimilazione dell’azoto

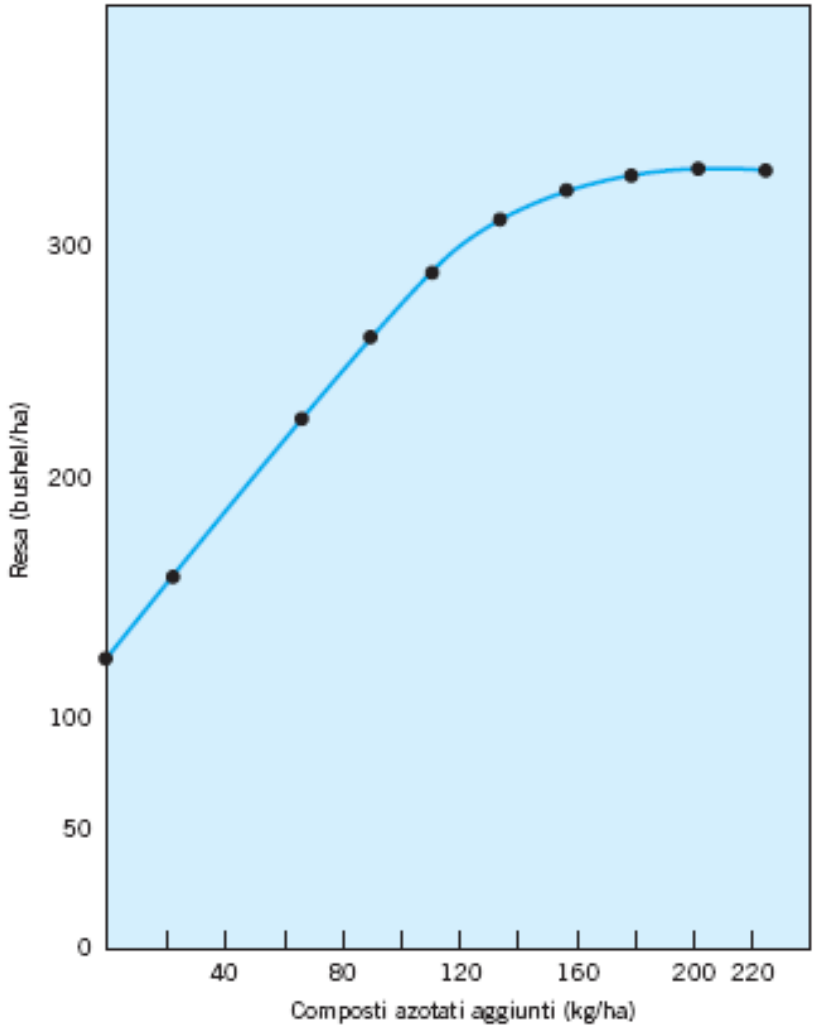
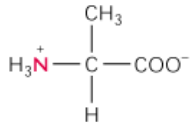


FIGURA 8.13 Effetto dell'applicazione di fertilizzanti azotati sulla produttività del mais (in *bushels*/ha)[4].

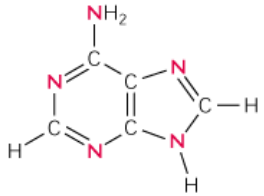




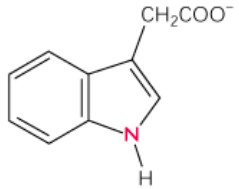
1 bushel (barile) = 25.4 kg di mais



Alanine
(an amino acid)



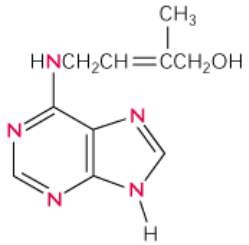
Adenine
(a nucleoside base)



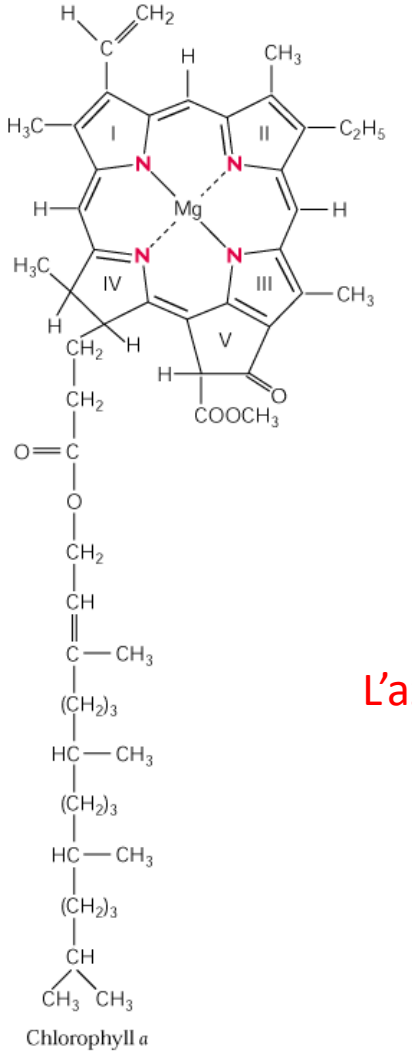
Indoleacetic acid
(IAA, an auxin)



Nicotine
(an alkaloid)



Zeatin (*Zea mays*)
(a cytokinin)



Chlorophyll *a*

L'azoto è incorporato in composti organici essenziali

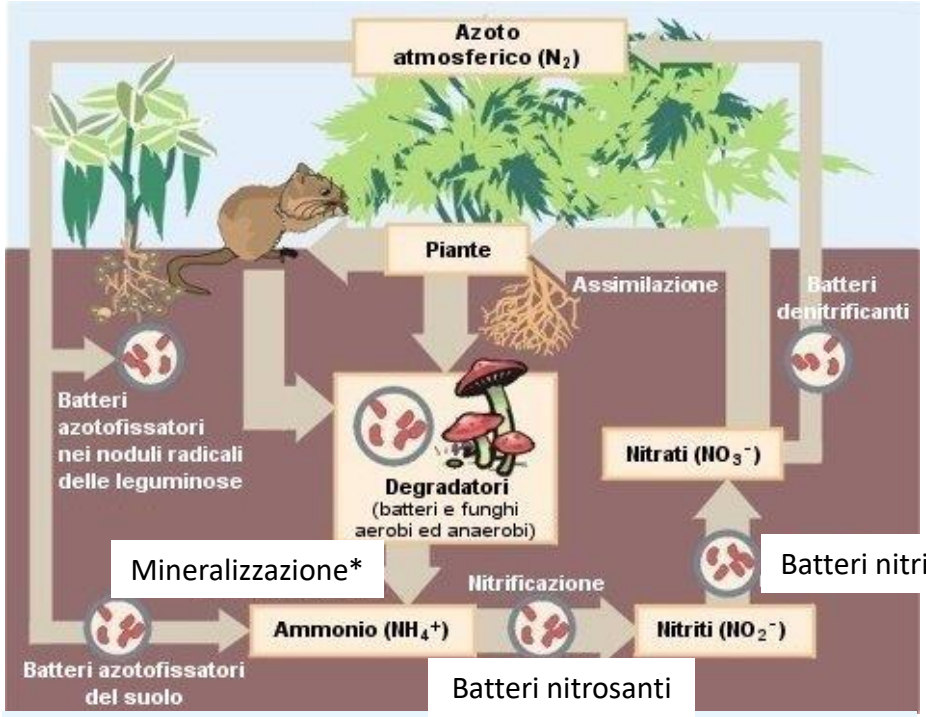
I DIVERSI STATI DI OSSIDAZIONE DELL'AZOTO

TABELLA 5.1.
Stati di ossidazione dell'atomo di azoto

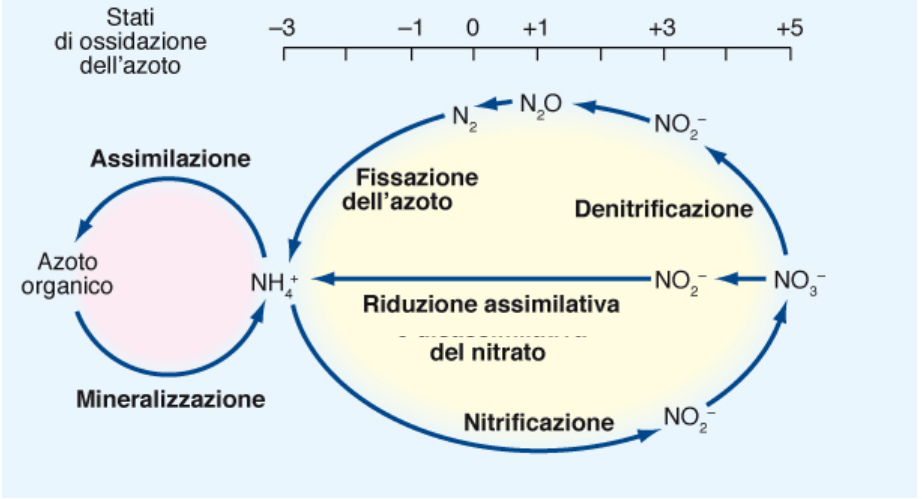
Numero di ossidazione	Composto	Ossiacidi
+5	Pentossido di diazoto o anidride nitrica (N_2O_5)	Acido nitrico (HNO_3)
+4	Biossido d'azoto (NO_2)	
+3	Triossido di azoto o anidride nitrosa (N_2O_3)	Acido nitroso (HNO_2)
+2	Ossido di azoto (NO)	
+1	Ossido di diazoto o Protossido d'azoto (N_2O)	
0	Azoto molecolare (N_2)	
−1	Idrossilammina (NH_2OH)	
−2	Idrazina (NH_2NH_2)	
−3	Ammoniaca (NH_3)	

L ‘azoto è presente nella biosfera in diverse forme: il ciclo dell’azoto

+ fissazione industriale di N_2



*In aerobiosi: ammonificazione
In anaerobiosi: putrefazone



INTERCONVERSIONE TRA LE VARIE FORME

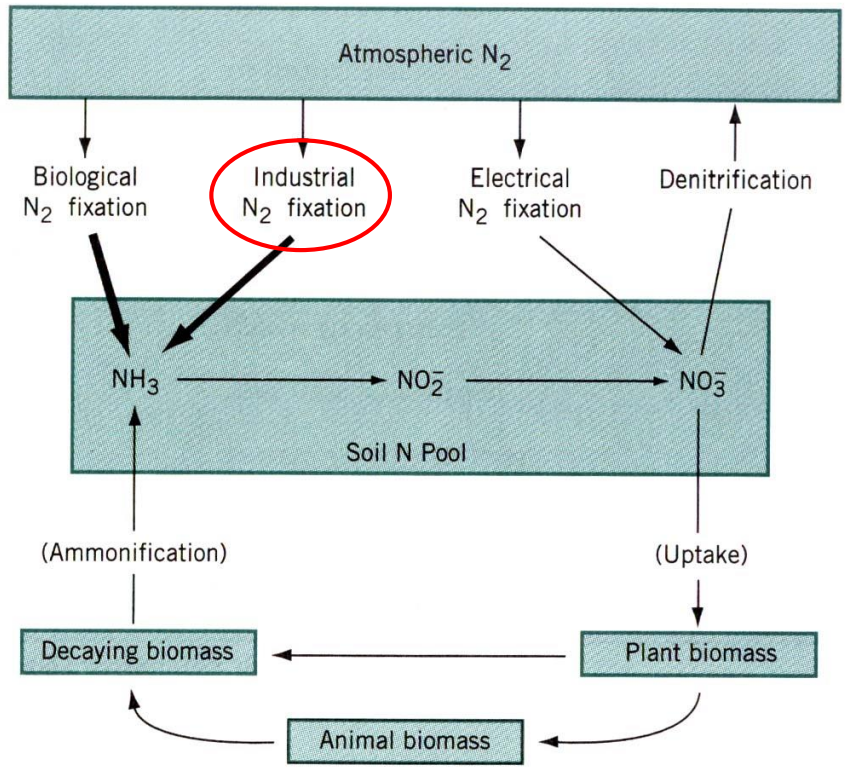


FIGURE 6.1 The nitrogen cycle, illustrating relationships between the three principal nitrogen pools: atmospheric, soil, and biomass.

L’atmosfera contiene grandi quantità di azoto molecolare non direttamente disponibile per gli organismi viventi

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3$$ 250 atm, 450° C

Fissazione industriale (Haber-Bosch)

Batteri e Cianobatteri → Fissazione biologica dell’azoto
T ambiente e P atmosferica

PRINCIPALI PROCESSI NEL CICLO DELL'AZOTO

TABELLA 12.1
Principali processi nel ciclo biogeochimico dell'azoto

Processo	Definizione	Tasso (10^{12} g anno^{-1})[a]	
Fissazione industriale	Conversione industriale di azoto molecolare in ammoniaca	80	30%
Fissazione atmosferica	Fulmini e conversione fotochimimca di azoto molecolare in nitrati	19	10%
Fissazione biologica	Conversione procariotica di azoto molecolare in ammoniaca	170	60%
Assorbimento dalle piante	Assorbimento dalle piante e assimilazione di ammonio o nitrato	1200	
Immobilizzazione	Assorbimento microbico e assimilazione di ammonio o nitrati	N/C	
Ammonificazione	Catabolismo di sostanza organica in ammonio per opera di funghi e batteri	N/C	
Anammox	Ossidazione anaerobica dell'ammonio: conversione batterica dell'ammonio e del nitrato in azoto molecolare	N/C	
Nitrificazione	Ossidazione dell'ammonio in nitrito per opera dei batteri (*Nitrosomonas* sp.) e successiva ossidazione batterica (*Nitrobacter* sp.) del nitrito in nitrato	N/C	
Mineralizzazione	Catabolismo di sostanza organica per opera di funghi e batteri in azoto minerale tramite processi di ammonificazione o nitrificazione	N/C	
Volatilizzazione	Perdita fisica di ammoniaca gassosa nell'atmosfera	100	
Fissazione dell'ammonio	Incorporazione fisica dell'ammonio nelle particelle del suolo	10	
Denitrificazione	Conversione batterica del nitrato in ossido d'azoto e azoto molecolare	210	
Percolamento di nitrato	Flusso di nitrato disciolto nelle acque profonde, lontano dal suolo di superficie e trasporto finale negli oceani	36	

Nota: Gli organismi terrestri, il suolo e gli oceani contengono rispettivamente $5{,}2 \times 10^{15}$ g; 95×10^{15} g e $6{,}5 \times 10^{15}$ g di azoto organico attivo nel ciclo. Assumendo costante la quantità di N_2 atmosferico (input = output) il *tempo medio di persistenza*, la quantità media di tempo che una molecola di azoto rimane in forma organica, è di circa 370 anni [(quantità totale)/(input di fissazione) = $(5{,}2 \times 10^{15}$ g + 95×10^{15} g)/(80×10^{12} anni^{-1} + 19×10^{12} anni^{-1} + 170×10^{12} anni^{-1})] (Schleisinger 1991).
[a]N/C, non calcolato.

30% 10% 60% N_2 che rientra negli ecosistemi acquatici e terrestri

Ciclo dell'azoto stabile da almeno 2,7 miliardi di anni: fortemente perturbato dalle attività umane negli ultimi cento anni.

La fissazione dell'azoto è aumentata rispetto al ciclo naturale.

Le piante possono organicare l’azoto atmosferico solo se in simbiosi con microrganismi

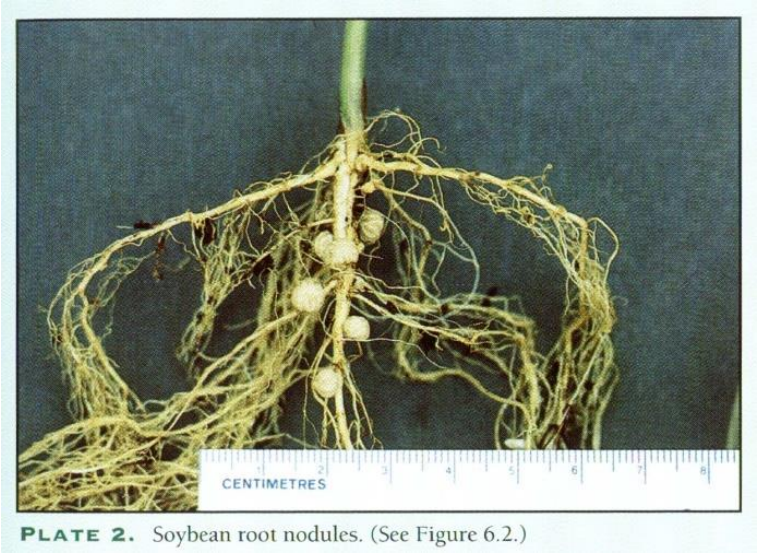


PLATE 2. Soybean root nodules. (See Figure 6.2.)

Le piante possono utilizzare autonomamente come fonte di azoto:
Nitrato (NO_3^-) o Ammonio (NH_4^+) presenti nei suoli

Quando disponibile, NH_4^+ assorbito maggiormente di NO_3^- (anche se questo è presente).

Due sistemi di trasporto passivo di NH_4^+ :

- Trasportatori AMT1 (uniporto) del plasmalemma

- Canali per K^+ poco selettivi

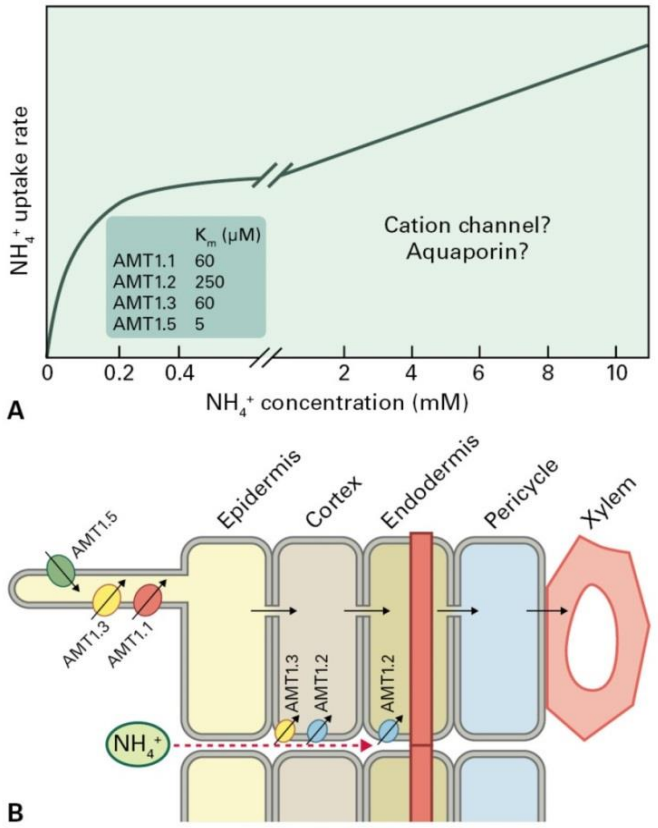


FIGURE 16.27 *Ammonium uptake. (A) Uptake by the high-affinity system demonstrates Michaelis–Menten kinetics, and uptake by the low-affinity systems demonstrates nonsaturating kinetics. In* Arabidopsis, *four ammonium transporters (AMT1.1, AMT1.2, AMT1.3, and AMT1.5) are involved in high-affinity uptake. The proteins required for low-affinity uptake have not been identified. (B) Schematic illustration of spatial expression pattern of* Arabidopsis *ammonium transporters in roots.*

Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Second Edition. Edited by Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, and Russell L. Jones.
© 2015 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2015 by John Wiley & Sons, Ltd.
Companion website: www.wiley.com/go/buchanan/biochem

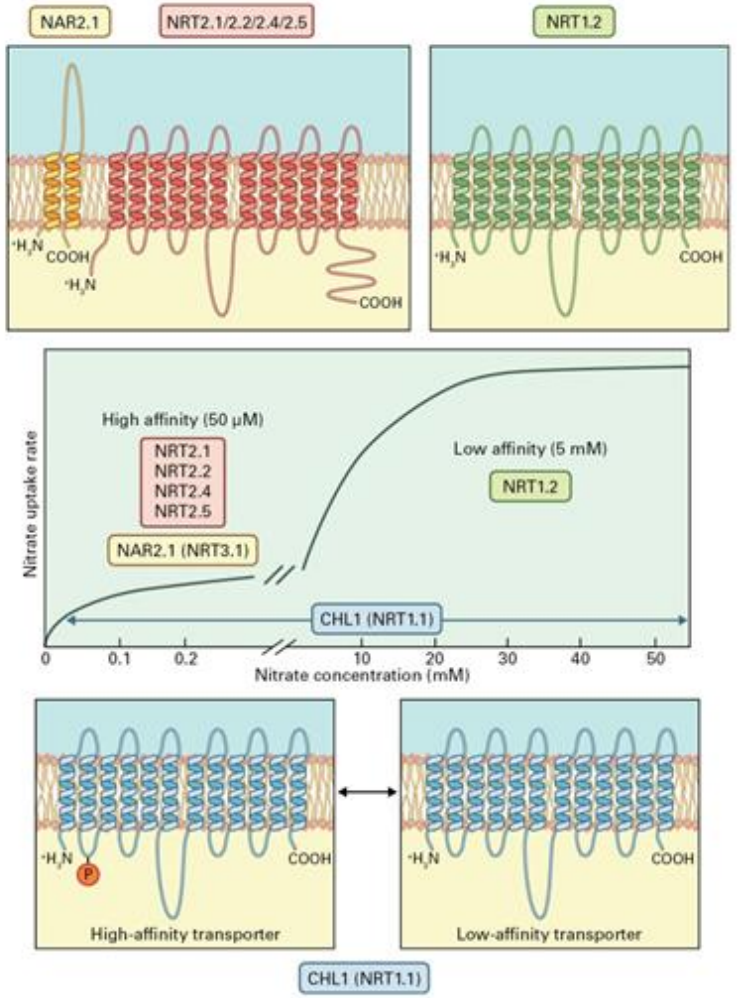
WILEY Blackwell

Il nitrato viene trasportato attivamente nelle cellule della radice

Assorbimento di NO_3^- regolato dalla presenza di NH_4^+ (forte inibitore dei trasportatori ad alta affinità dell'NO_3^-)

Cinetica di assorbimento con due fasi di saturazione

In *Arabidopsis*: trasportatore con affinità duale



Simporto, con sistemi ad alta e bassa affinità

FIGURE 16.31 *Kinetics of nitrate uptake. Nitrate uptake displays two saturated phases, with K_m in the micromolar range for the high-affinity system and in the mM range for the low-affinity system. In* Arabidopsis, *CHL1 (AtNRT1.1; shown in blue) is a dual-affinity nitrate transporter involved in both high- and low-affinity uptake, with the two action modes switched by phosphorylation/dephosphorylation of T101. AtNRT2.1 and AtNRT2.2 (shown in red) associated with AtNAR2.1 (shown in yellow) are involved in high-affinity uptake, while AtNRT1.2 (shown in green) participates in low-affinity uptake.*

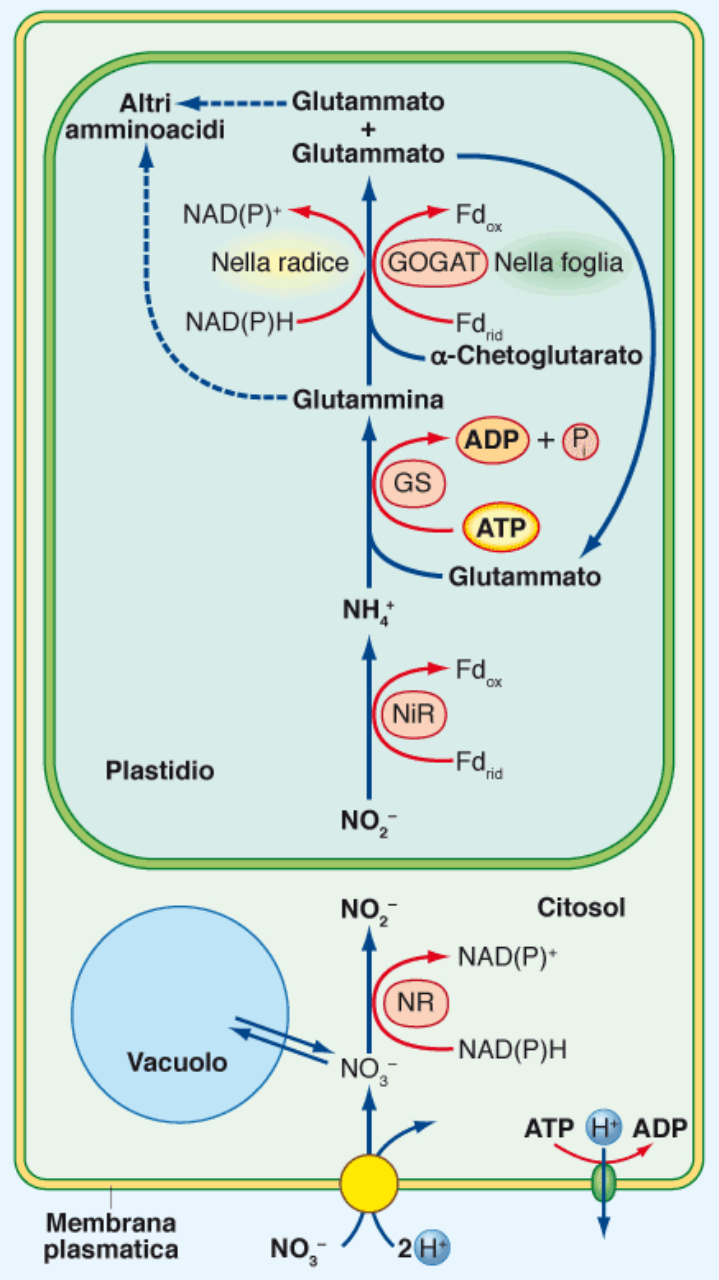
Destino del NITRATO nel citosol di cellule radicali:

- Vacuoli (riserva)
- Riduzione assimilativa nelle cellule radicali (aa di trasporto: ammidi e ureidi)
- Caricamento xilematico e riduzione assimilativa nelle foglie

ASSIMILAZIONE (riduzione assimilativa) DEL NITRATO

- Riduzione del Nitrato a Nitrito (citosol)
- Riduzione del Nitrito ad Ammonio (plastidi)
- Organicazione dell'Ammonio in Amminoacidi

RIDUZIONE ASSIMILATIVA DEL NITRATO



Glutammato sintasi (GOGAT)

Glutammina sintetasi (GS)

Nitrito reduttasi (NiR)

Nitrato reduttasi (NR)

Riduzione del nitrato a nitrito (citosol)

NITRATO REDUTTASI

Omodimero costituito da 2 subunità proteiche di ca. 100 kDa
Famiglia dei molibdenoenzimi

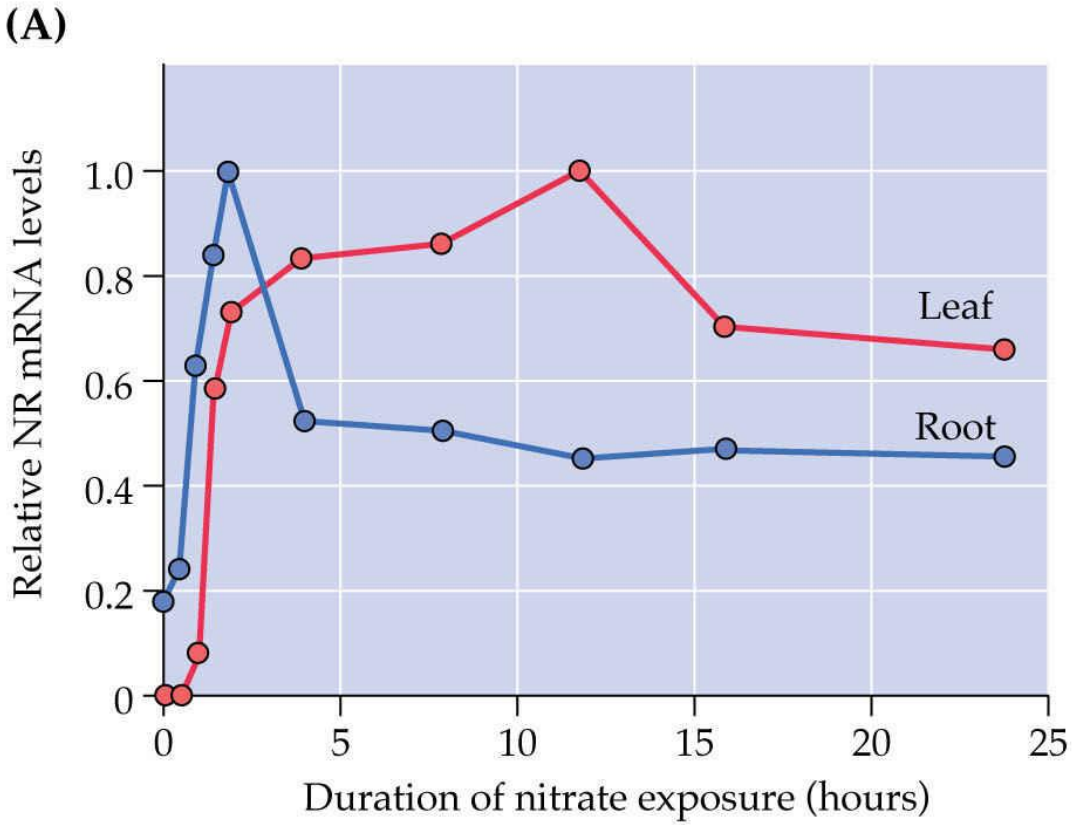
$$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \rightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$$

Presente sia nelle radici che nelle foglie

Regolazione della nitrato reduttasi

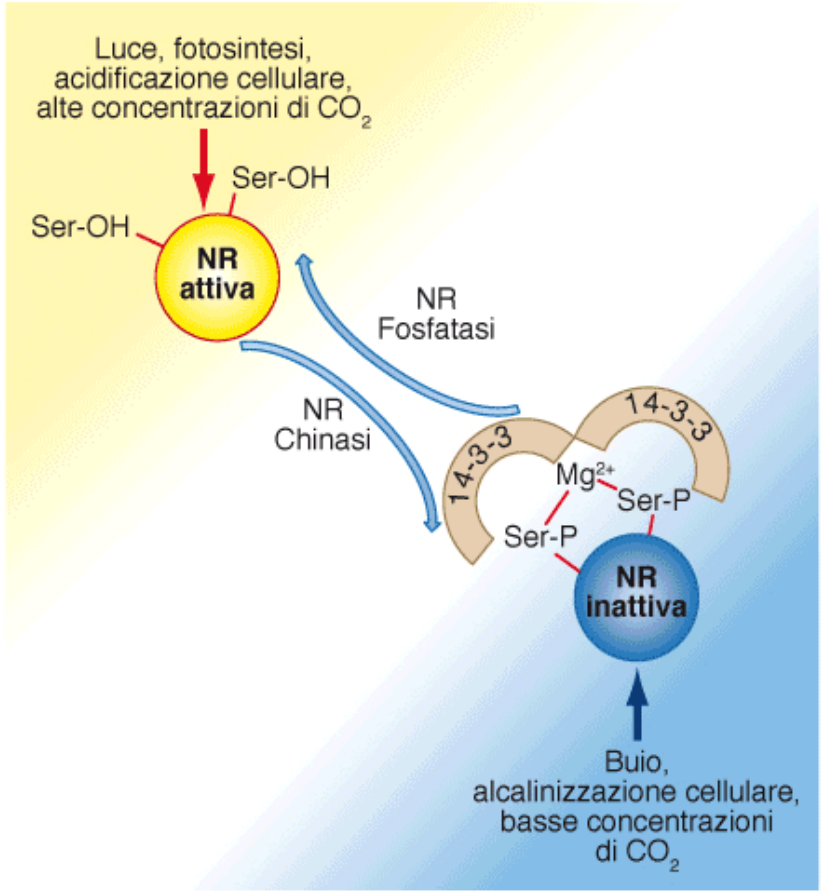
Sintesi e attività della NR:
Aumentano se bassi livelli di glutammina e elevata quantità di nitrato,
Diminuiscono se alti livelli di glutammina e bassa q. di nitrato
Inibite dall'NH_4^+ (inibisce sintesi di ATP)

1- Regolazione trascrizionale



Seven day old barley seedlings grown in the absence of nitrate were treated with 15 mM nitrate at time zero

2- Regolazione post-traduzionale della nitrato reduttasi



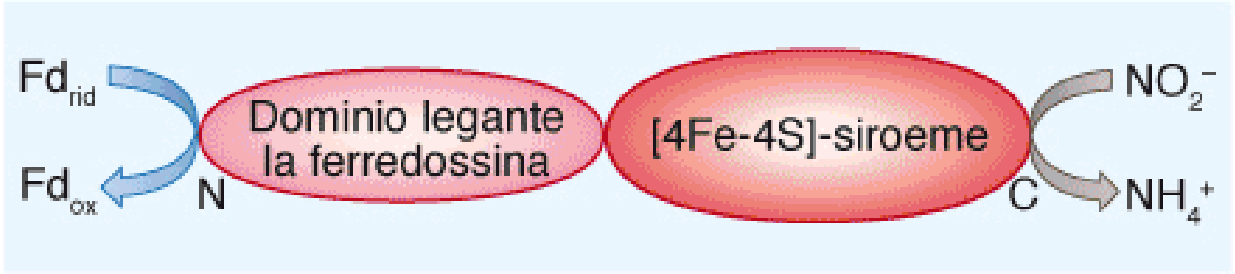
Regolazione:
- Cicli diurni
- Luce

L'attività della NR diminuisce in carenza di azoto, al buio o a bassa [CO_2]:
NR chinasi è favorita da alti livelli citosolici di Ca^{2+}

Riduzione del nitrito ad ammonio (plastidi)

Nitrito reduttasi:

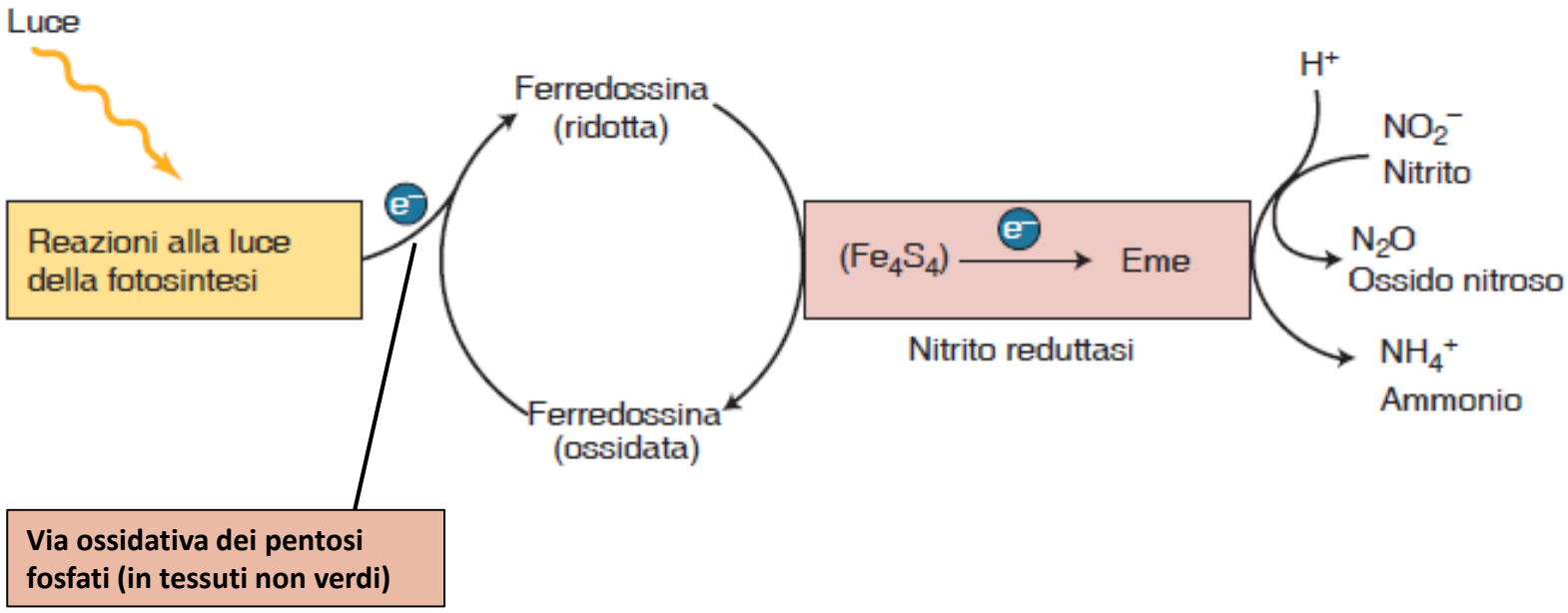
Monomero di 60-70 kDa, con 2 domini funzionali (N e C terminali) e cofattori coinvolti nel trasferimento di elettroni da Fd a nitrito.



$$NO_2^- + 6Fd_{red} + 8H^+ + 6e^- \rightarrow NH_4^+ + 6Fd_{ox} + 2H_2O$$

Regolazione trascrizionale per mantenere un eccesso di NiR rispetto a NR. Luce ed elevate concentrazioni di NO_3^- inducono espressione del gene per NiR. Accumulo di glutammina e asparagina reprimono l'espressione.

Nelle foglie la fonte di ferredossina ridotta è la fotosintesi



Nelle radici la ferredossina è ridotta dal NADPH generato dalla via ossidativa dei pentosi fosfati

Flussi dei composti azotati nella pianta

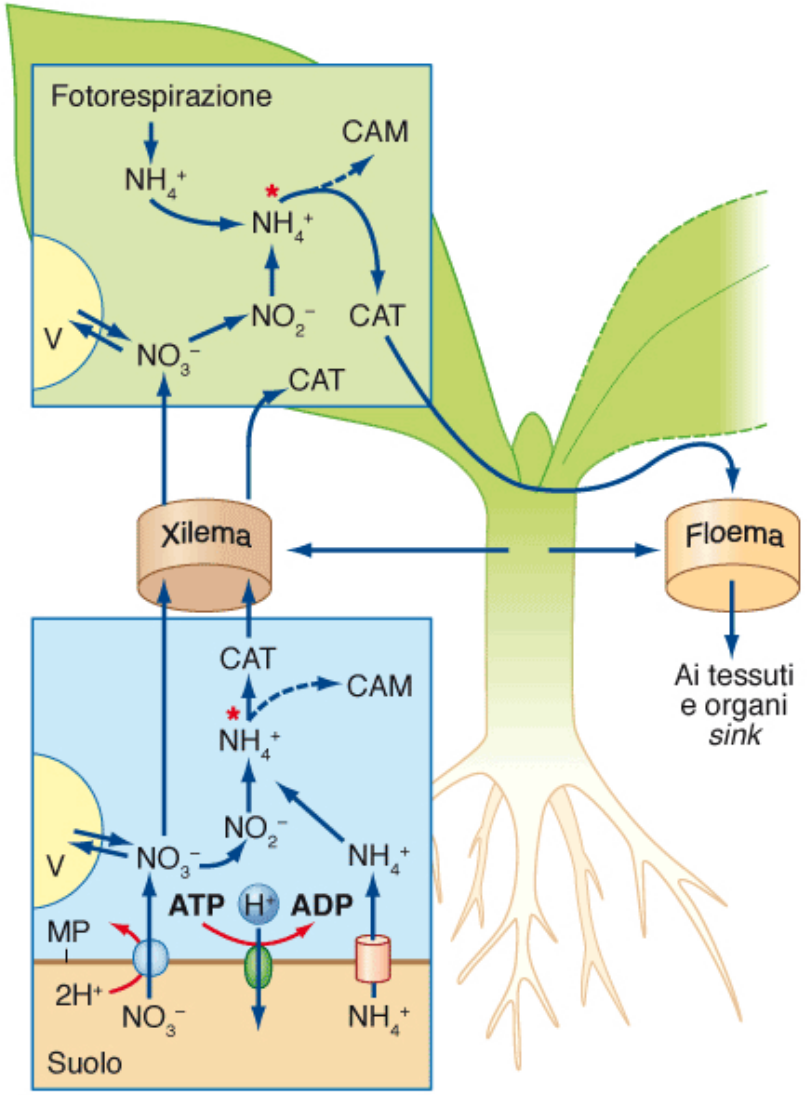
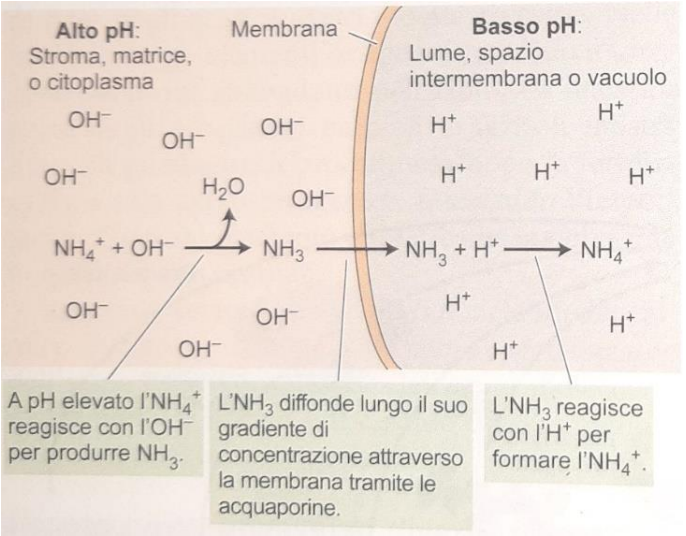


Figura 7.2 Schema semplificato delle forme di azoto assorbite dal suolo, dei siti di riduzione e assimilazione e dei flussi di composti azotati nella pianta. È indicata anche la fotorespirazione come fonte di ammonio nelle cellule fotosintetiche. Nella figura non vengono rappresentati i compartimenti cellulari in cui avvengono le diverse tappe dei percorsi metabolici. (CAM = composti organici azotati richiesti per il metabolismo cellulare; CAT = composti organici azotati di trasporto; MP = membrana plasmatica; V = vacuolo. Gli asterischi indicano gli eventi di assimilazione dell'ammonio che portano alla produzione di composti organici dell'azoto).

* NH_4^+:

- tossico ad elevate concentrazioni: dissipa gradienti protonici transmembrana



- deve essere assimilato prontamente (nella radice)

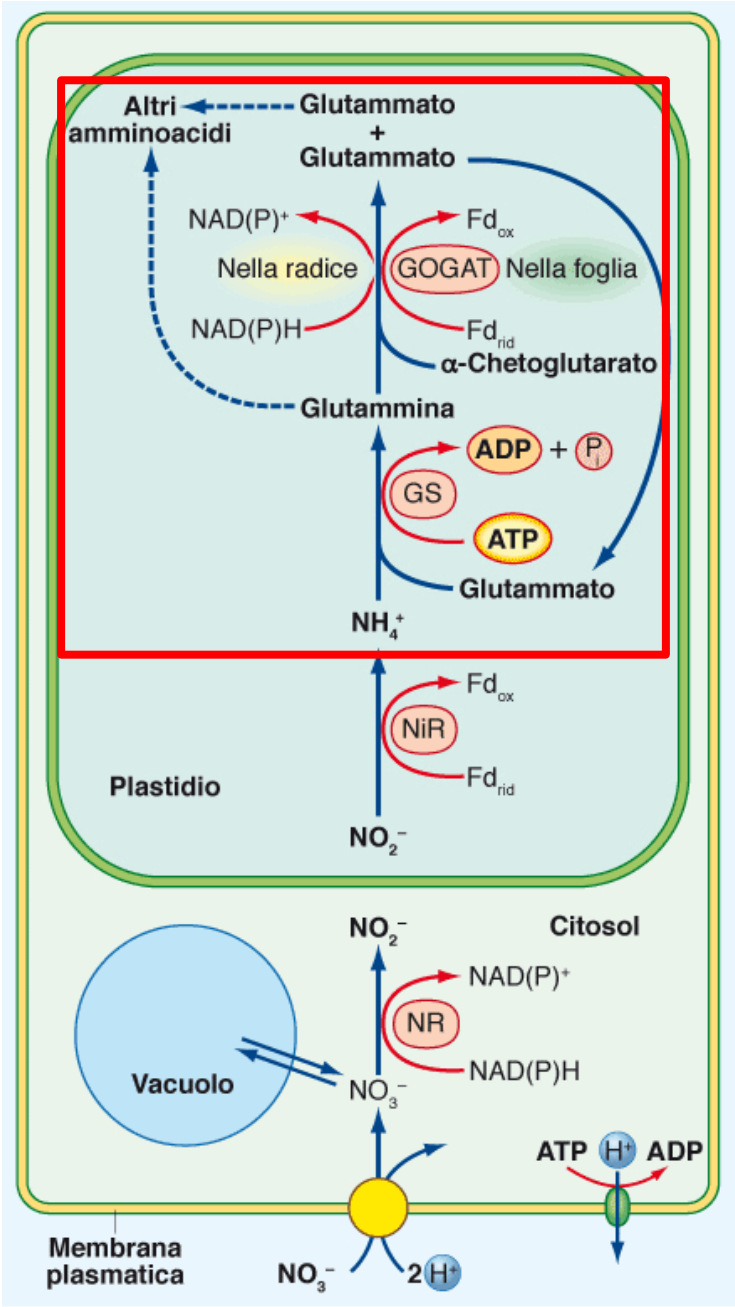
ASSIMILAZIONE DELL'AMMONIO

SONO NECESSARI DUE ENZIMI

GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

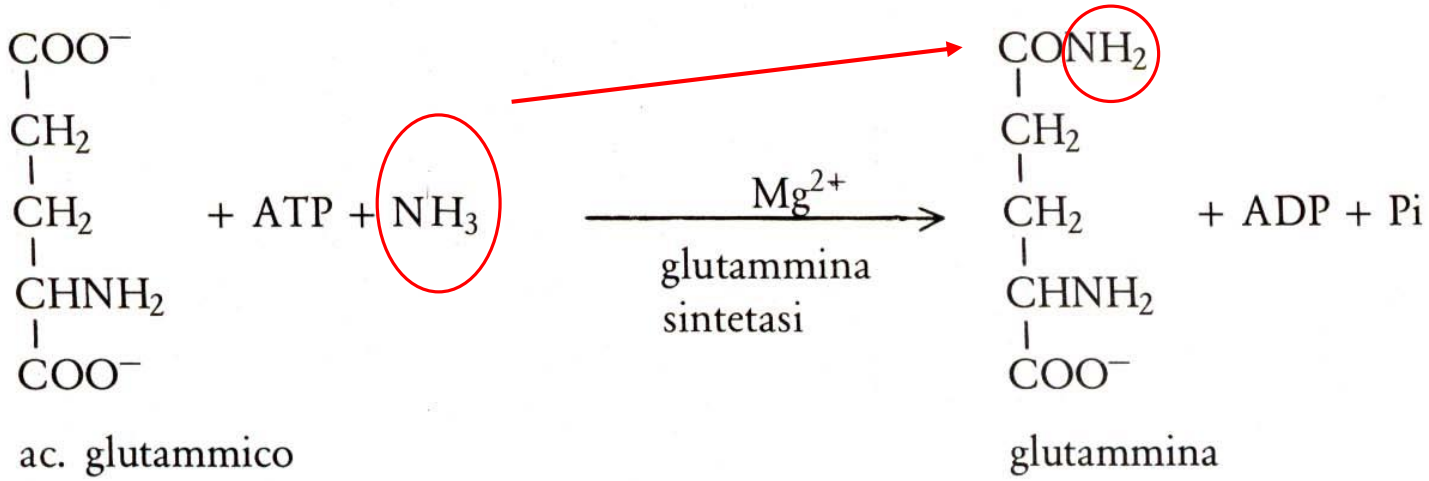
GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT
= glutammato oxoglutarato aminotransferasi)

Coinvolti nell'assimilazione primaria dell'azoto nonché nella riassimilazione (assimilazione secondaria) dello ione ammonio liberato da altri processi metabolici (es. fotorespirazione, deamminazione di amminoacidi ecc…)



GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

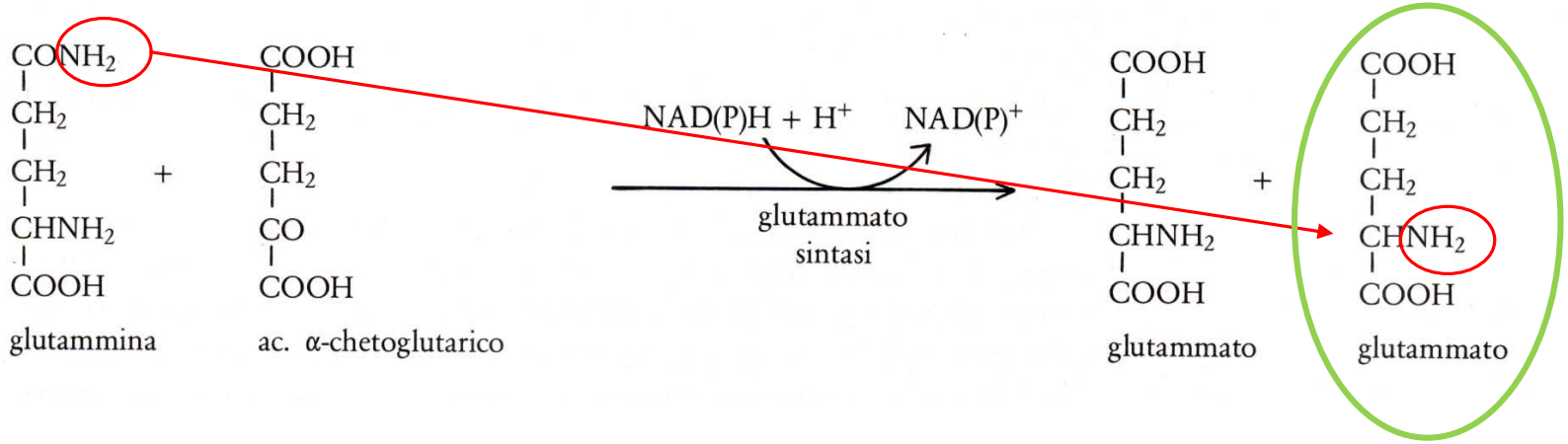
Elevata affinità per NH_4^+, K_m = 3-5 μM
Espressione di GS stimolata da luce e alta concentrazione di carboidrati
Coinvolge cofattori (cationi bivalenti)



GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

Trasferimento riduttivo
Stimolata da alta concentrazione di glutammina

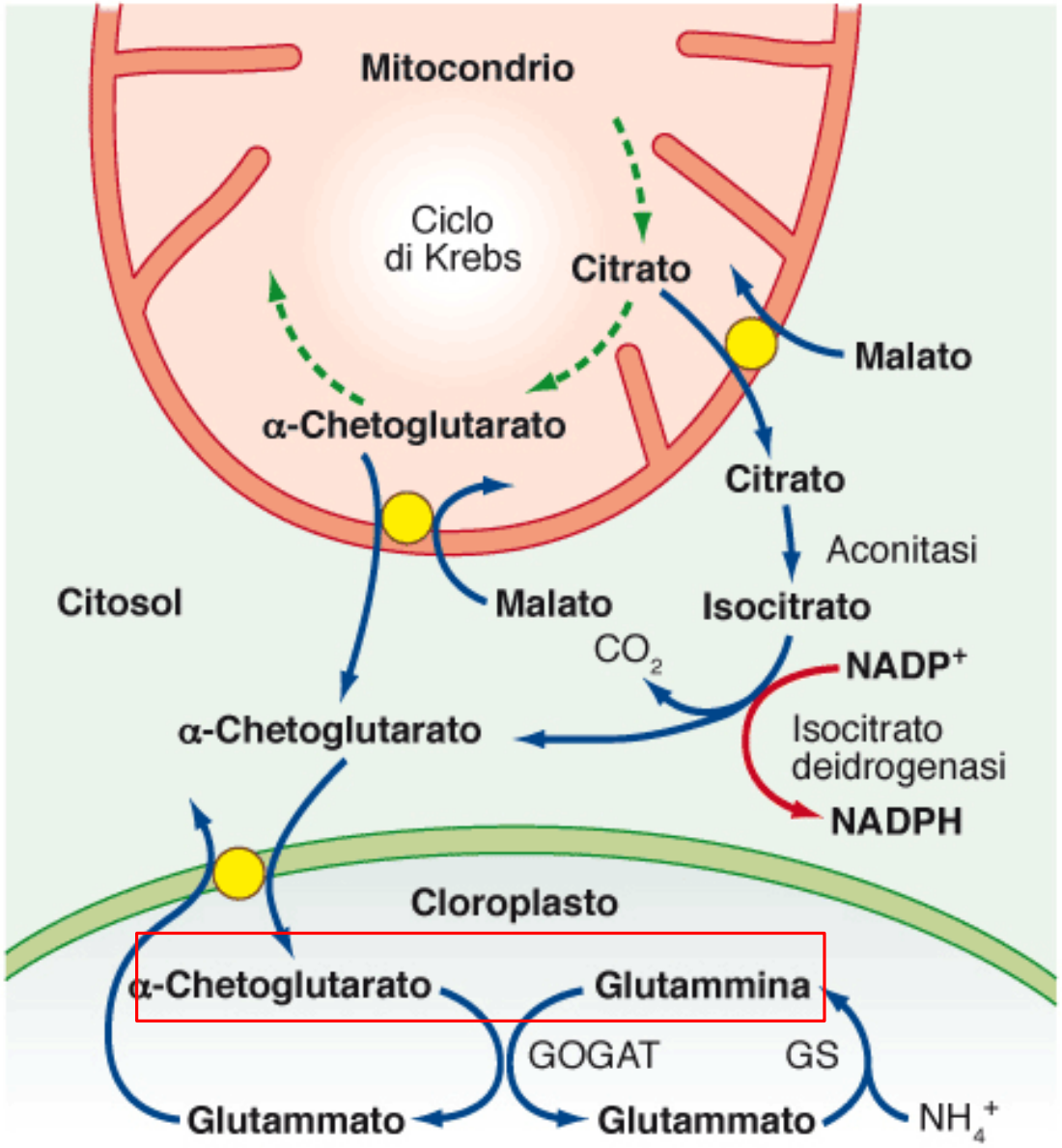
Guadagno netto in azoto organico



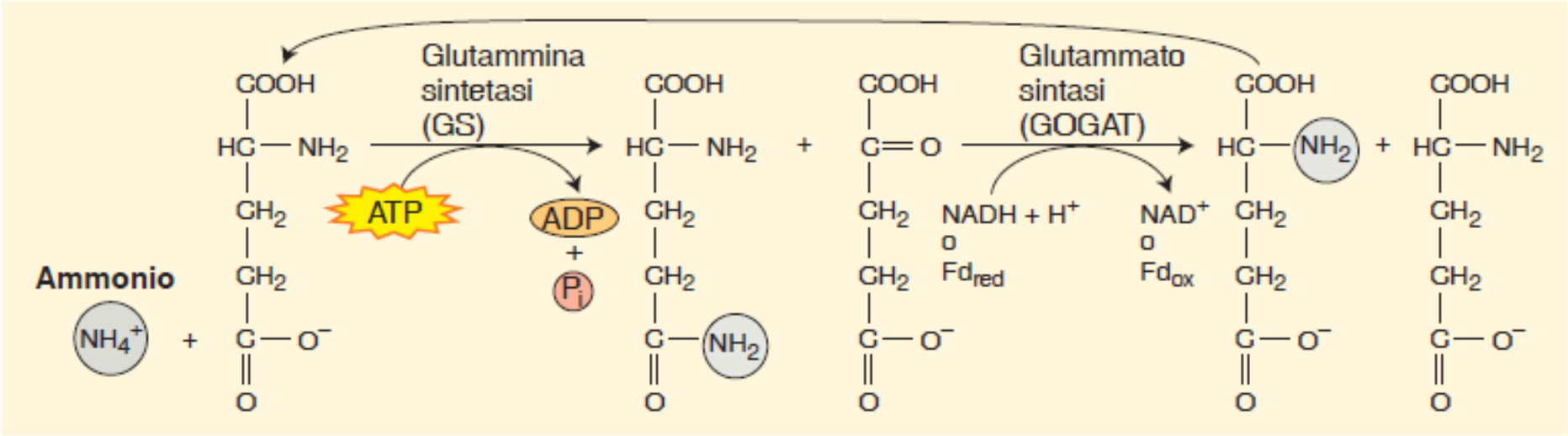
Nelle foglie il composto riducente è la ferredossina ridotta

Nella radici il composto riducente è l'NAD(P)H

Interazione con il metabolismo mitocondriale



Riassumendo…



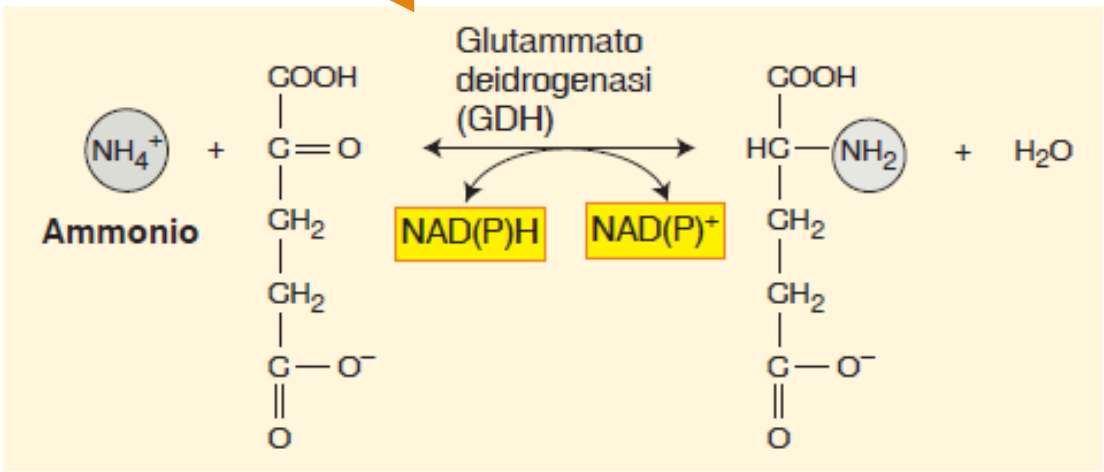
GLUTAMMATO DEIDROGENASI (GDH)

K_m per l'ammonio 10-80 mM: ruolo secondario nell'assimilazione

Due isoforme: presente in mitocondri (NADH) e plastidi (NADPH)

Funziona nella deamminazione del glutammato per la riallocazione dell'azoto, oppure se carenza di carbonio per il ciclo di Krebs, catabolismo aa in cellule senescenti, etc..

Deamminazione ossidativa

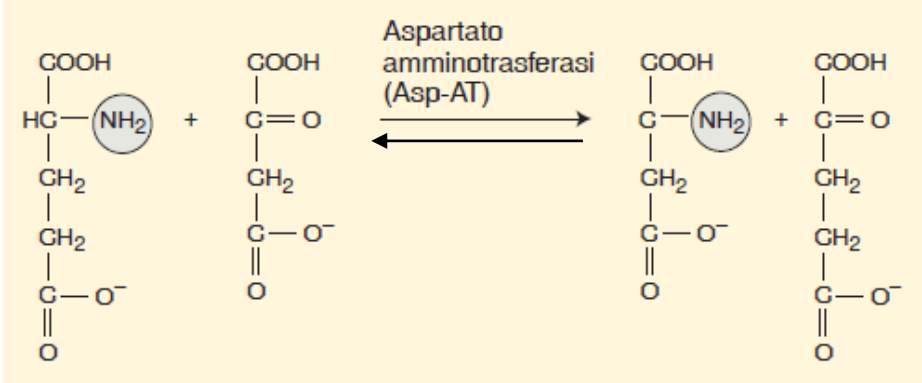


(α-Chetoglutarato)

amminazione riduttiva

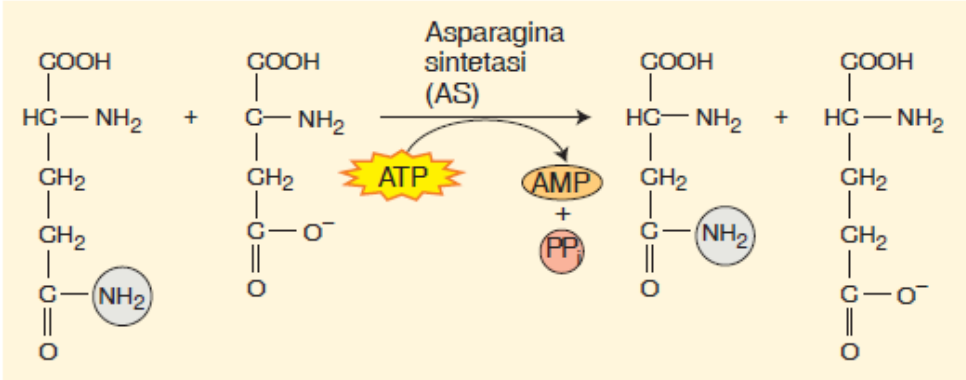
L’azoto incorporato in glutammina/glutammato può essere incorporato in altri amminoacidi

Reazioni di transamminazione (amminotransferasi)



Glutammato **Ossalacetato** **Aspartato** **2-Oxoglutarato** (= α-Chetoglutarato)

Mitocondri, cloroplasti, perossisomi.
Reazione reversibile. Asp-AT coinvolta anche nel catabolismo dell’aspartato.



Glutammina **Aspartato** **Asparagina** **Glutammato**

Citosol di cellule radicali e fogliari

Via principale di sintesi di asparagina.
Composto chiave per trasporto e accumulo azoto (elevato rapporto N:C)

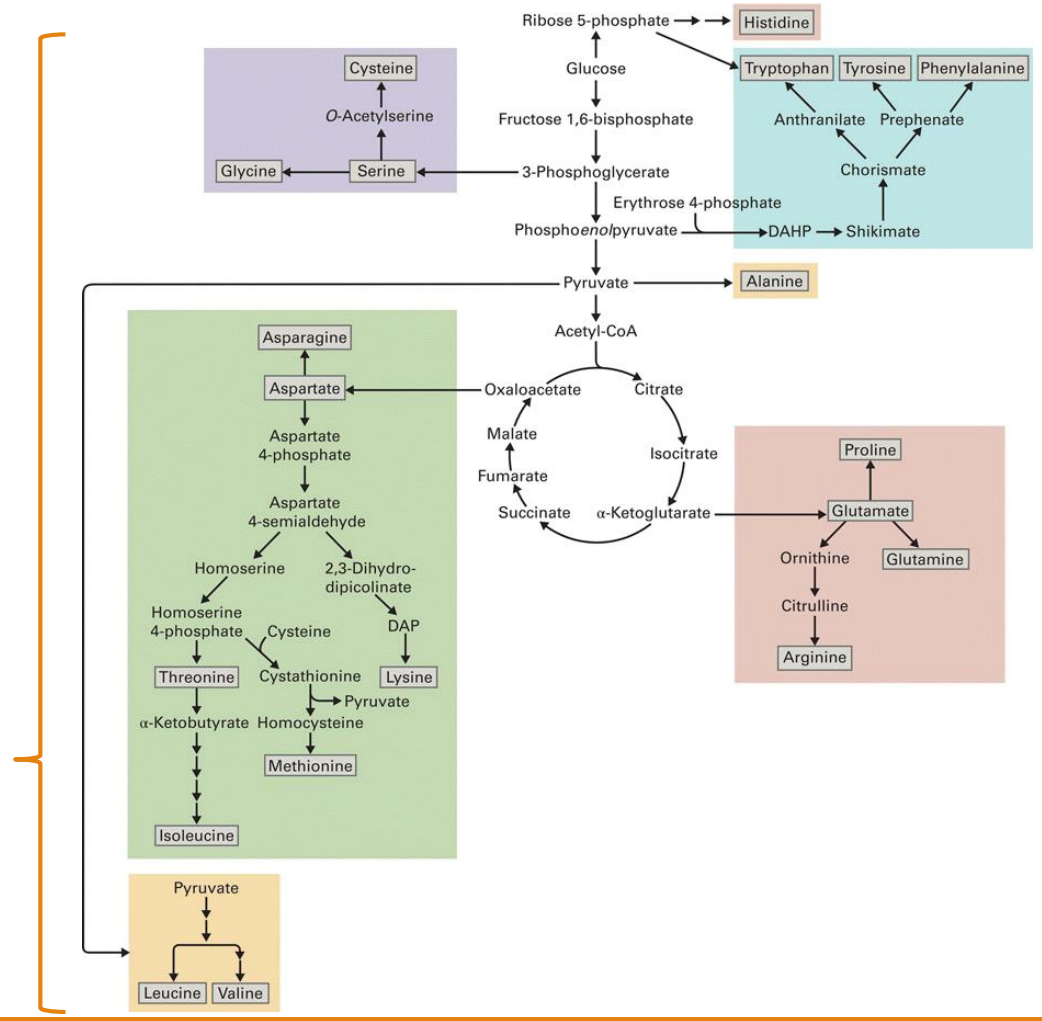
Le piante sintetizzano tutti i 20 amminoacidi comuni nelle proteine

Amminoacidi essenziali: istidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, (arginina)

NH_2 da reazioni di transaminazione con: Glutammato, Glutammina, Aspartato

Scheletri carboniosi derivano da:
3-P Glicerato, Fosfoenolpiruvato, Piruvato (glicolisi)

α-chetoglutarato, ossalacetato (ciclo di Krebs)



Fissazione biologica dell'azoto

Processo responsabile della maggior parte della fissazione di N_2 atmosferico

Batteri azotofissatori (procarioti diazotrofi)

- allo stato libero nel suolo
- in simbiosi con le piante

Batteri azotofissatori

TABELLA 12.2
Alcuni esempi di organismi che compiono la fissazione dell'azoto

Fissazione simbiontica dell'azoto

Pianta ospite	Genere di procariota azoto-fissatore
Piante leguminose: *Parasponia*	*Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium*
Piante attinorriziche; ontano (albero), *Ceanothus* (cespuglio), *Casuarina* (albero), *Datisca* (cespuglio)	*Frankia*
Gunnera	*Nostoc*
Azolla (felce d'acqua)	*Anabaena*
Canna da zucchero	*Acetobacter*

Fissazione dell'azoto in batteri liberi

Tipo di batterio	Genere azoto-fissatore
Cianobatteri (alghe verdazzurre)	*Anabaena, Calothrix, Nostoc*
Altri batteri	
Aerobici	*Azospirillum, Azotobacter, Beijerinckia, Derxia*
Facoltativi	*Bacillus, Klebsiella*
Anaerobici	
Non fotosintetici	*Clostridium, Methanococcus* (Archebatterio)
Fotosintetici	*Chromatium, Rhodospirillum*

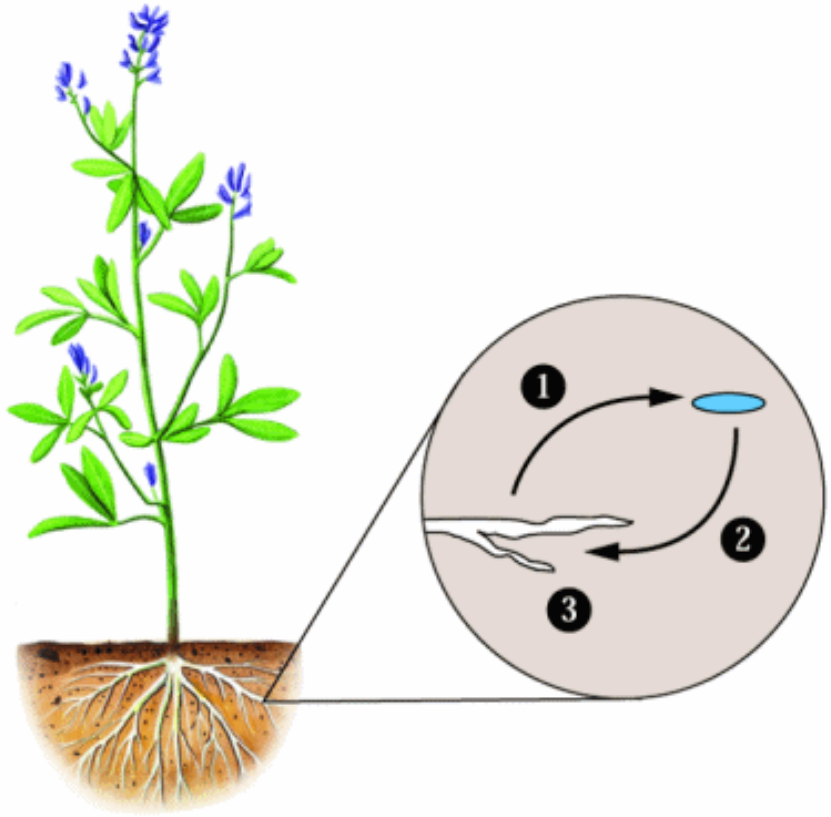
Simbiosi rhizobia/leguminose

TABELLA 8.1 Alcuni esempi di specificità nelle simbiosi dei rizobii con le leguminose

Batterio	Ospite
Azorhizobium	*Sesbania*
Bradyrhizobium japonicum	*Glycine* (soia)
Rhizobium meliloti	*Medicago* (erba medica, alfaalfa)
	Melilotus (meliloto)
Rhizobium leguminosarum	
biovarietà *viciae*	*Lathyrus* (pisello odoroso)
	Lens (lenticchia)
	Pisum (pisello)
	Vicia (fava)
biovarietà *trifolii*	*Trifolium* (trifoglio)
biovarietà *phaseoli*	*Phaseolus* (fagiolo)
Rhizobium loti	*Lotus* (ginestrino)



Simbiosi rhizobia/leguminose



1 Plant root releases elicitors of *Nod* gene expression.

2 Bacterium releases Nod factor.

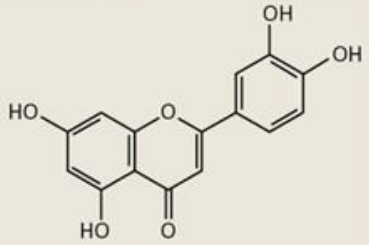
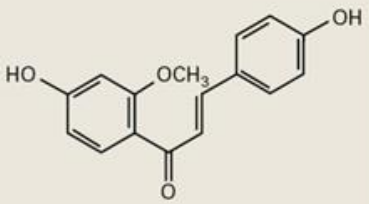
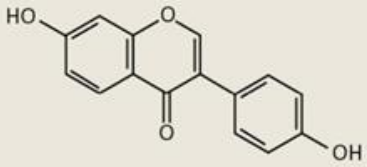
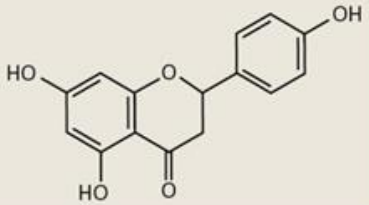
3 Plant root demonstrates ion fluxes, expresses nodulin proteins, is infected, and undergoes nodule morphogenesis.

L'instaurarsi della simbiosi richiede uno scambio di segnali biochimici tra pianta e batteri

Flavonoidi: attraggono i batteri e attivano la proteina NodD

Host compounds that actively induce *nod* gene expression

Flavonoid inducers

Category	Name/activity	Specific structure
Flavone	Luteolin, a flavone inducer from *Medicago* spp., active on *S. meliloti*	
Chalcone	4,4′-Dihydroxy-2′-methoxychalcone, a chalcone inducer from *Medicago*	
Isoflavone	Daidzein, an isoflavone active on *B. japonicum*	
Flavanone	Naringenin, a flavanone active on *R. leguminosarum* bv. *viciae*	

L'espressione dei geni *nod* da parte dei batteri dipende dal segnale chimico inviato dalla pianta (es. flavonoidi) e dalla proteina NodD batterica

Rizobi: geni *nod* (nodulazione)

Geni nod comuni:
nodA, nodB, nodC

Geni nod ospite specifici:
nodP, nodH, nodQ, nodE, nodF, nodL

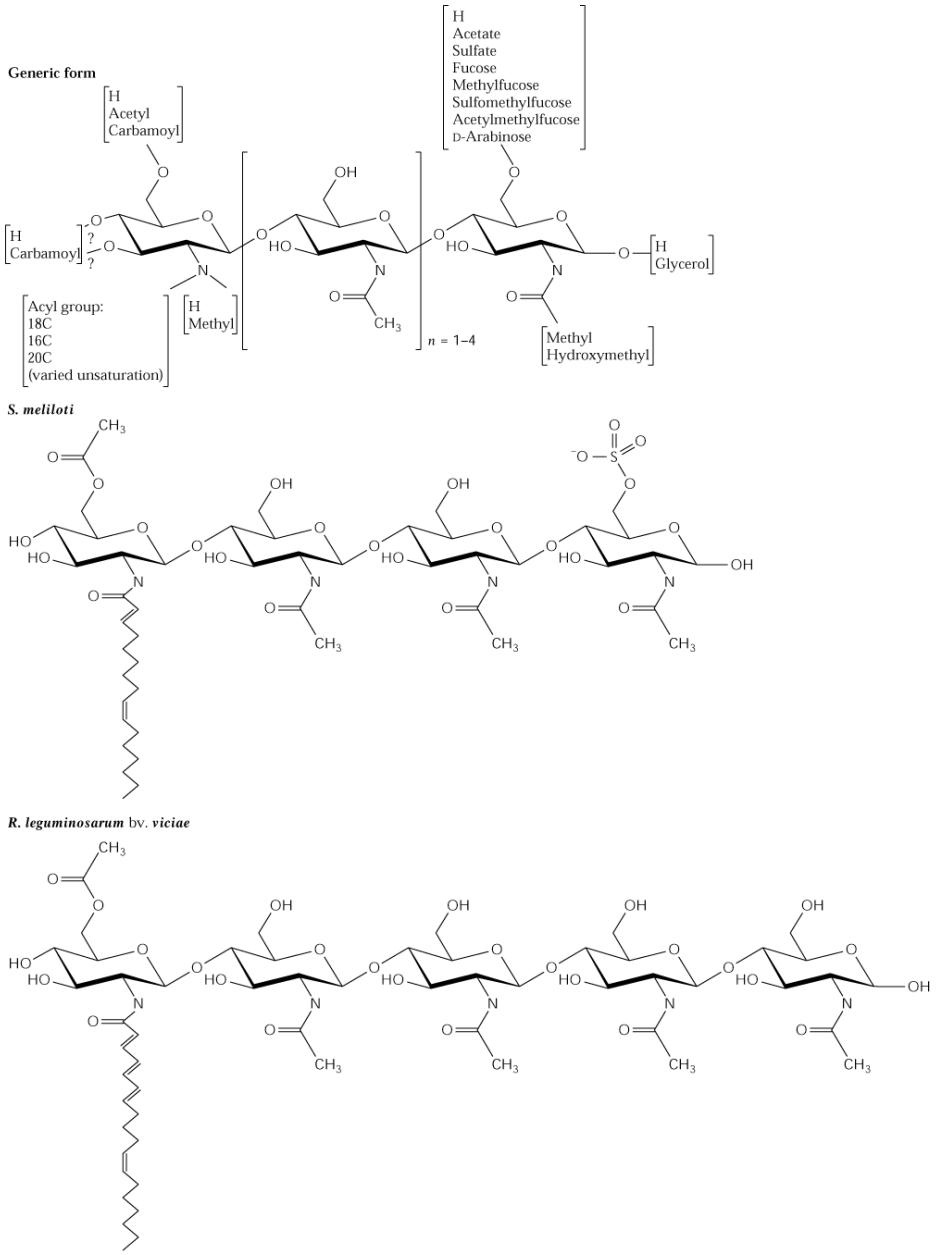
Solo uno dei geni nod, il *nodD*, è espresso costitutivamente:
prodotto proteico NodD (batterico) che regola la trascrizione degli altri geni *nod* che codificano per proteine di nodulazione coinvolte nella produzione dei fattori Nod

I geni *nod,* attivati da NodD, codificano per enzimi di biosintesi dei fattori Nod

I fattori Nod sono
lipo-chitin-oligosaccaridi

Struttura base:
N-acetilglucosammina

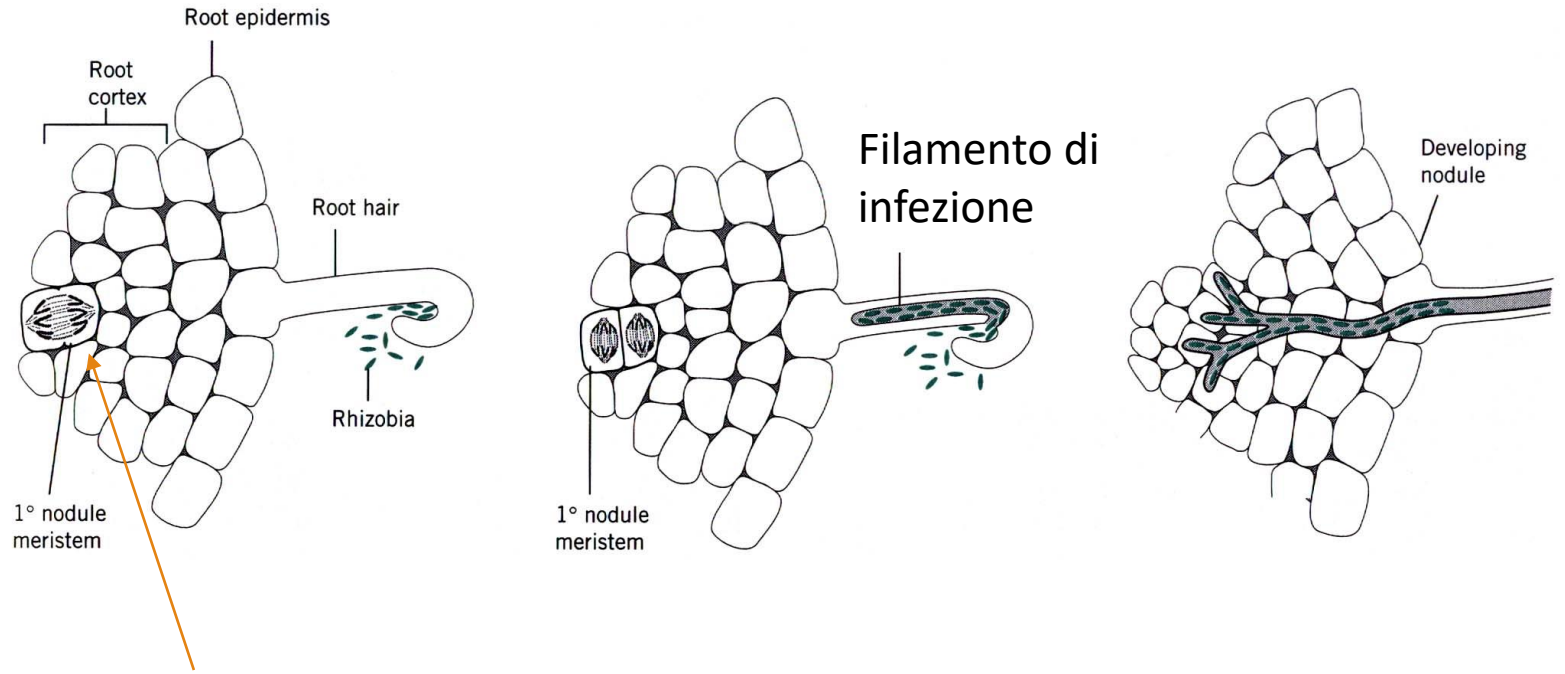
Sono segnali per la simbiosi
(fattori di nodulazione)



FORMAZIONE DEL NODULO RADICALE

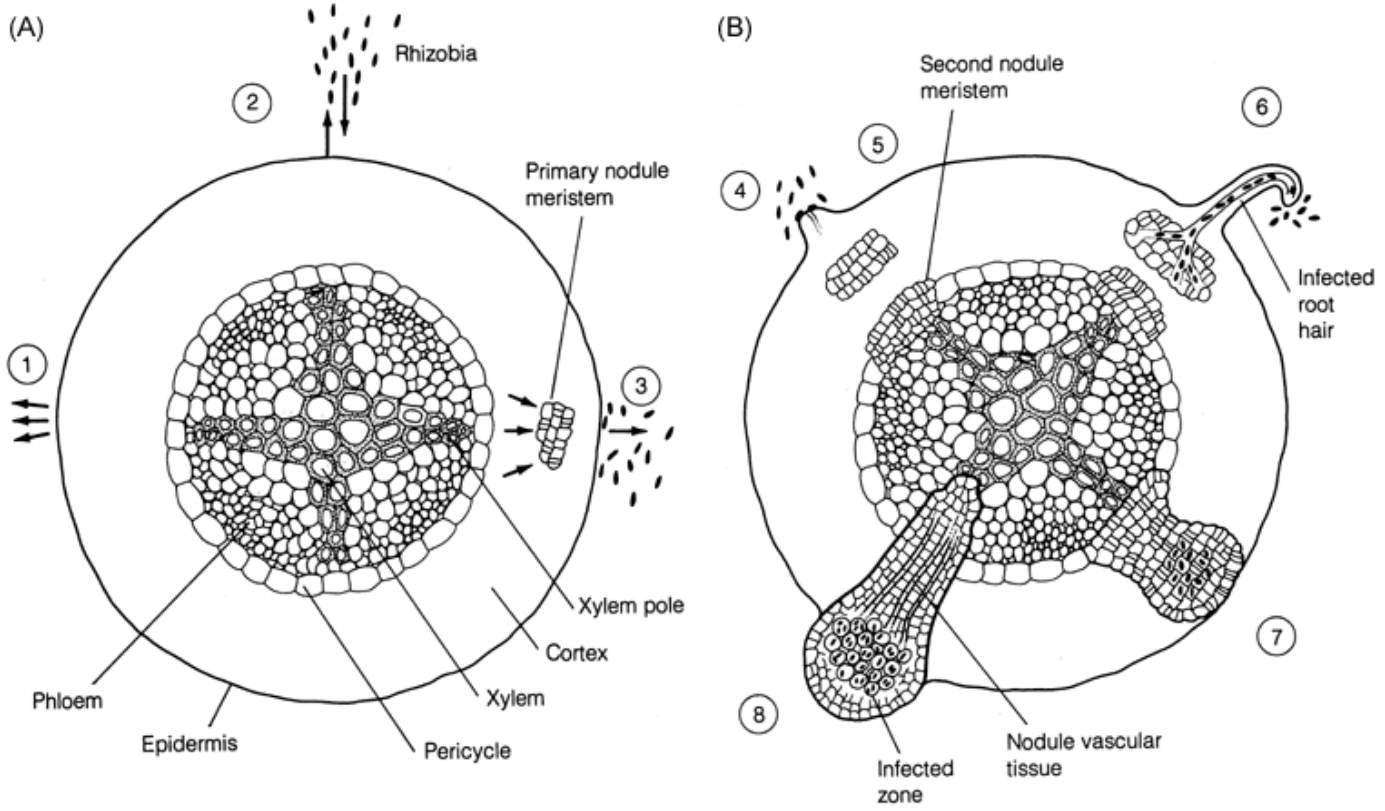
- **INFEZIONE**
- **ORGANOGENESI**

Il processo di infezione



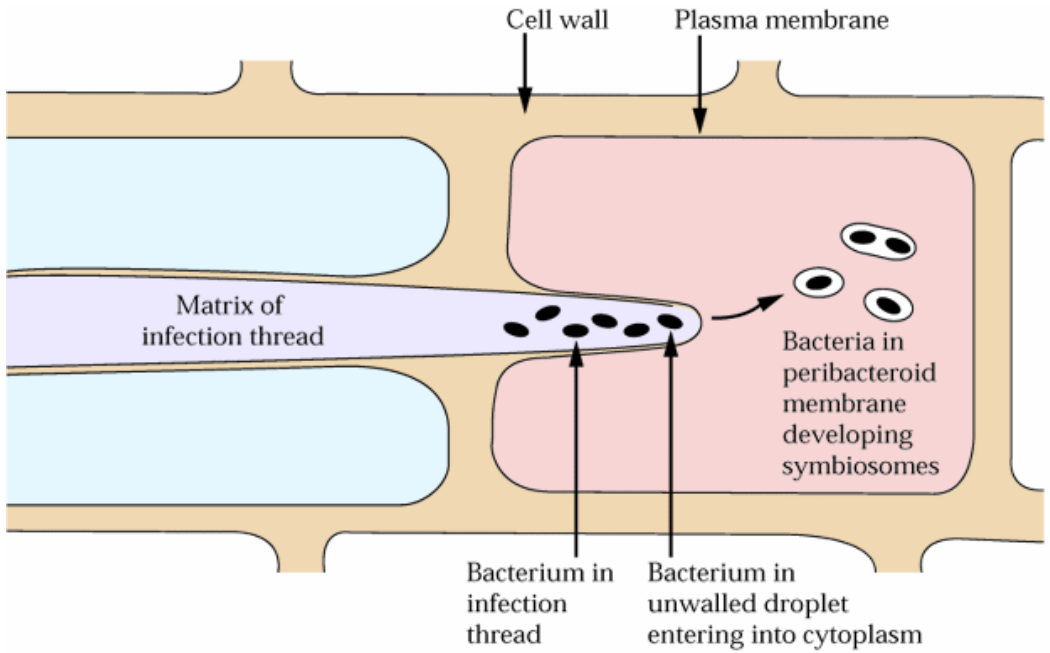
Primordio del nodulo

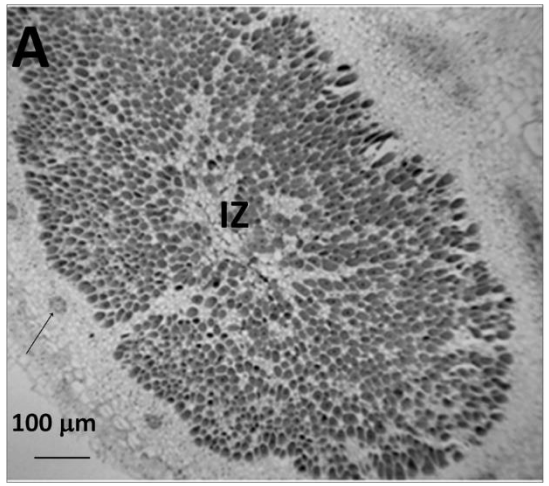
Sviluppo di un nodulo radicale di soia

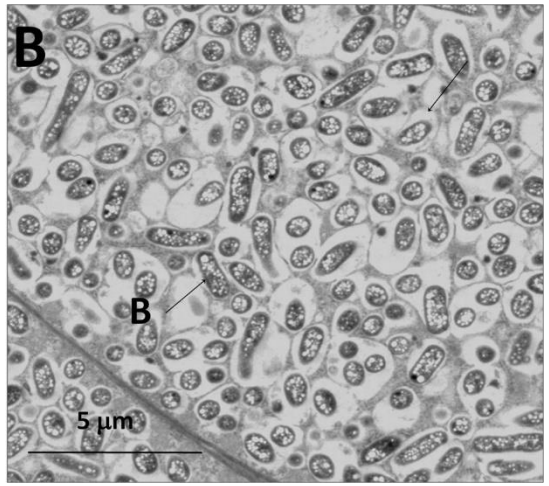


Divisioni cellulari in cellule del cortex (meristema primario del nodulo) e del periciclo (meristema secondario del nodulo)

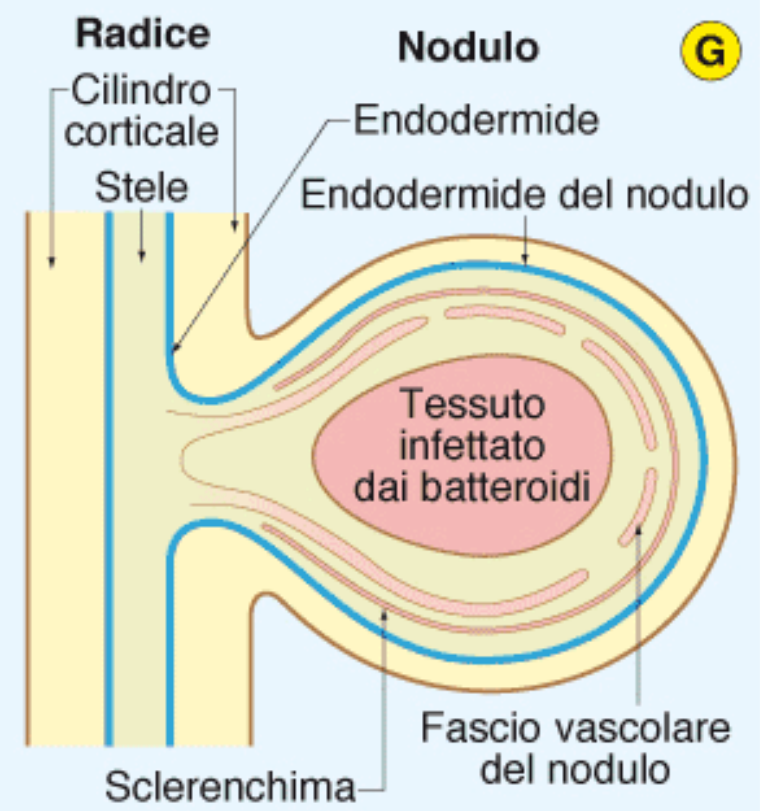
Rilascio dei batteri dal filamento di infezione







Batteroidi + membrana paribatteroidea = simbiosoma





Colorazione rosa del tessuto di infezione interno:
leghemoglobina (emoglobina vegetale) nel citosol delle cellule infettate dai simbiosomi

N_2 è fissato dalla nitrogenasi (in tutti i procarioti diazotrofi)

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i \quad (12.9)$$

Tabella 12.4 Reazioni catalizzate dalla nitrogenasi

$N_2 \rightarrow NH_3$	Fissazione di azoto molecolare
$N_2O \rightarrow H_2 + H_2O$	Riduzione del protossido d'azoto
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Riduzione dell'azide
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Riduzione dell'acetilene
$2H^+ \rightarrow H_2$	Produzione di H_2
$ATP \rightarrow ADP + P_i$	Attività idrolitica dell'ATP

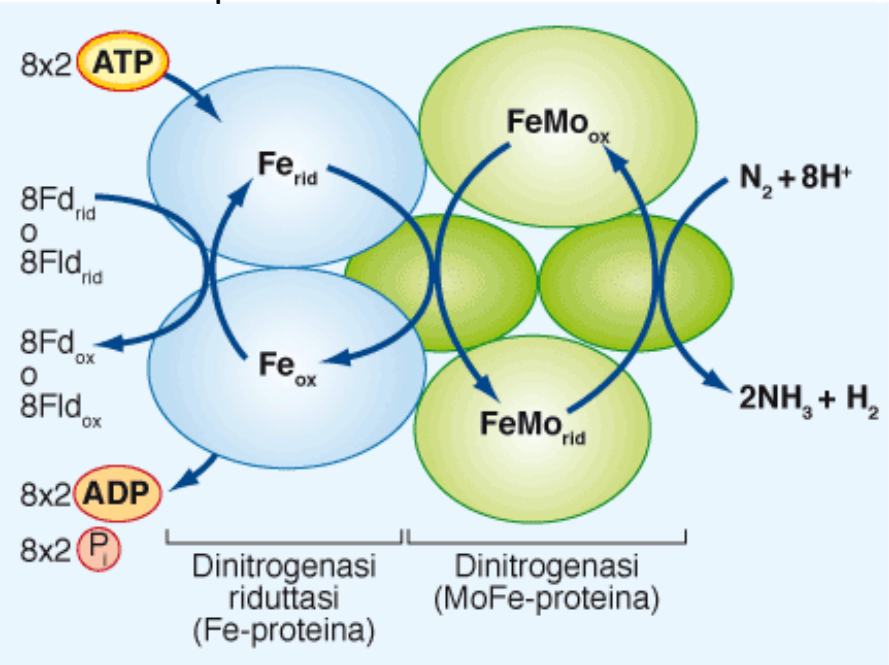
Fonte: Da Burris 1976

Schema della reazione catalizzata dalla nitrogenasi

Complesso fatto da 2 enzimi distinti

Donatore elettroni:

ferredossina
o
flavodossina



6 eventi di trasferimento di e^- per ogni N_2 da ridurre

Fe proteina (dinitrogenasi reduttasi):
Omodimero (α_2) di 40-70 kDa
2 subunità
1 gruppo 4Fe-4S per ogni dimero
Inibita da O_2

MoFe proteina (dinitrogenasi):
Eterotetramero (α_2 ,β_2) di 250 kDa
4 subunità
2 gruppi Mo-Fe-S (cofattori FeMo);
2 gruppi Fe-S (gruppi P)
Inibita da O_2

Richiesto un grande input energetico (16 ATP)

Vengono consumati 12 g di C per g di N fissato

La resa energetica della reazione è diminuita a causa della produzione di H_2 (perdita del 30-60% dell'energia fornita alla nitrogenasi).
Consumo di 2 elettroni e idrolisi di 4 ATP.

Alcuni batteri/piante possiedono l'enzima idrogenasi irreversibile che ossida H_2 a 2 H^+ con produzione di NADH:
NADH può essere ossidato attraverso la catena respiratoria per produrre 3 ATP. Consumo di O_2