Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Transformação de plantas para fixação de nitrogênio

Igor Segura Coutinho 8969454
Jonathas Eliel de Oliveira 9818294
Paula Martins Nery 8969965
Rafael Yuji Tani 8512447

Trabalho apresentado à disciplina LGN0232: Genética Molecular

Piracicaba
2016

Igor Segura Coutinho 8969454
Jonathas Eliel de Oliveira 9818294
Paula Martins Nery 8969965
Rafael Yuji Tani 8512447

Transformação de plantas para fixação de nitrogênio

Responsável pela disciplina:
Profª Drª **CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO**

Colaboradora na disciplina:
Estagiária PAE Responsável: **MARIANA DA SILVA LOPES**

Trabalho apresentado à disciplina LGN0232: Genética Molecular

Piracicaba
2016

SUMÁRIO

RESUMO.....5
ABSTRACT.....7
1 INTRODUÇÃO 9
1.1.....10
1.2.....10
2 OBJETIVOS.....13
3 METODOLOGIA 15
3.1.....16
3.2.....16
3.3.....17
3.4.....17
4 DISCUSSÃO.....20
REFERÊNCIAS.....22

RESUMO

Transformação de plantas para fixação de nitrogênio

O trabalho busca abordar a Fixação Biológica de Nitrogênio a nível de transformações genéticas em plantas para inserir o complexo de genes que codificam a enzima nitrogenase e os demais fatores que criam um ambiente favorável para sua atividade. Discorre-se também, de maneira simplificada, o que são transformações genéticas e qual o possível método a ser utilizado para a obtenção das plantas modificadas que portam o complexo gênico desejável para a FBN, desafios a serem enfrentados até chegar a um resultado eficiente.

Palavras-chave: FBN; Fixação; Biológica; Nitrogênio; Nitrogenase; Desafios

ABSTRACT

Plants transformation for nitrogen fixation

The study searches a way to explain the Biological Nitrogen Fixation in a level of genetic transformations in plants to insert the complex of gens that encodes the nitrogenase enzyme and other factors that create an enabling environment for its activity. It also discusses, in a very simplified way, what genetic transformations are and what probably is the method that can be used to obtain modified plants that carry the searched complex of gens to do the BNF, challenges to be done until a final and efficient result.

Keywords: BNF; Biological; Nitrogen; Fixation; Nitrogenase; Challenges

1 INTRODUÇÃO

O Nitrogênio (N) é um elemento que está envolvido nas principais reações bioquímicas das plantas, constitui vários compostos dos vegetais, como os ácidos nucleicos, clorofila e os aminoácidos que formam as enzimas e proteínas. O N possui especial importância nos ciclos biogeoquímicos e no metabolismo das plantas por causa de sua grande versatilidade nas reações de oxirredução.

Também é um elemento químico muito abundante na atmosfera terrestre, onde é encontrado na sua forma mais estável (N2) e, consequentemente, indisponível para a maioria dos organismos, sendo eles vegetais ou animais. No N2 há uma forte ligação tríplice entre as duas moléculas, o que dá essa estabilidade. Apenas algumas espécies de bactérias, que formam um grupo de organismos procariotos e unicelulares possuidores da enzima nitrogenase, são capazes de realizar a redução do N2 a NH+3, forma inorgânica combinada. Esse processo biológico é denominado de fixação biológica do nitrogênio, mais abreviadamente FBN, de acordo com ALCANTARA, R. M. C. M. de; ARAÚJO, A. P. de; XAVIER, G. R.; ROCHA, M. de M.; RUMJANEK, N. G (2010).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) desempenha um papel importante na deposição de nitrogênio nos sistemas agrícolas. Estimativas apontam que, no mundo, esse processo contribua com 32 Tg/ano de N nas áreas cultivadas. No Brasil, a FBN contribui com cerca de 7,3 Tg/ano de N, praticamente três vezes a quantidade de N de fertilizantes industriais (que seria de 2,5 Tg ano/1), sendo que só a cultura da soja representa 3,2 Tg/ano de N, segundo FILOSO (2006).

O processo de FBN pode ser afetado por fatores biológicos, químicos e físicos, que interferem na simbiose mutualista. Dessa forma, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinada espécie sob determinadas condições edáficas e ambientais, é proveniente de fatores que limitam o estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nas leguminosas, os fatores limitantes da simbiose estão relacionados às características intrínsecas da espécie hospedeira, aos fatores climáticos, às condições edáficas e à população nativa de rizóbios.

Com relação à espécie hospedeira, entre as espécies nodulíferas existe ampla variação com relação ao potencial de fixação biológica, que pode ser

classificado como baixo, médio e alto. Há relatos de que em condições idênticas *Leucaena leucocephala* pode fixar 400 a 900 kg de N ha-1ano-1 enquanto que *Canavalia ensiformis* apenas 57 a 190 kg de N ha-1ano-1 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É importante ressaltar que essa diferente proporção de nitrogênio fixado pode ser afetada de acordo com o genótipo de cada planta, duração do ciclo da cultura e também nodulação tardia e senescência precoce dos nódulos.

1.1 RELAÇÃO SIMBIÓTICA

Plantas com rizóbios são consideradas leguminosas endossimbióticas que são capazes de promover seu crescimento através da FBN (Masson-Boibin et al., 2009). Em geral, a associação entre leguminosas e os microrganismos formadores dos rizóbios são muito específicas (Bauer, 1981). Há, entretanto, rozóbios isolados que mostram baixa especificidade à planta hospedeira e à indução da formação do nódulo em várias espécies leguminosas. A FBN pela relação simbiótica de espécies com rizóbios não é a única característica que ajuda no crescimento e adaptação de plantas (Hayat et al., 2010; Granada et al. 2014).

1.2 TRANSFORMAÇÕES GENÉTICAS

Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo é lento, necessitando vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade (Christou, 1992).

A engenharia genética de plantas não só acelera o processo de melhoramento, como permite transpor as barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, utilizando os métodos de transformação (Moraes & Fernandes, 1987).

A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucléicos exógenos em um genoma receptor, sem comprometer a viabilidade das células. Com os avanços da tecnologia de DNA recombinante, é possível transferir para plantas genes isolados de outras plantas, ou mesmo de animais e

microrganismos (Perani et al., 1986), permitindo a criação de novas variedades que podem ser usadas em programas de melhoramento convencional. Até o presente, diversos genes foram introduzidos estavelmente em plantas, conferindo resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos e resistência a estresses ambientais, de acordo com SANTARÉM, E. R. (2000).

2 OBJETIVOS

Ao estudar os métodos atuais de adubação, observa-se que os mesmos são caros e não tão eficientes e também que a maneira mais vantajosa de se obter a fixação desse macro nutriente seria por uma fixação biológica, pois essa ocorreria durante todo o desenvolvimento da planta sem gerar custos adicionais ao produtor. Porém, o grande desafio ainda é introduzir os genes da fixação diretamente nas plantas, pois atualmente a fixação só ocorre em simbiose pela ação de microrganismos, daí a FBN passaria a ocorrer sem a simbiose em qualquer planta portadora do gene, sendo leguminosa ou não.

Eis, portanto, a necessidade de mais pesquisas e de testes para o desenvolvimento de uma maneira eficiente de inserir o complexo de gene da nitrogenase na planta para que a enzima tenha poder catalítico para realizar a fixação direta e com eficiência, mas até o momento tudo tem se mostrado um grande e trabalhoso desafio.

3 METODOLOGIA

Há 20 anos atrás foi proposto que os cloroplastos deveriam ser os locais mais sustentáveis e apropriados para a inserção dos genes da fixação de nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio requer uma grande quantidade de energia na forma de ATP e os cloroplastos são produtores desse substrato como uma consequência da energia fotossintética. A sensibilidade da enzima nitrogenase ao O2 (oxigênio), um grande produto da fotossíntese, o que impediria a fixação do N2 pelos cloroplastos, mas cianobactérias também conduzem fotossíntese oxigenada apesar de fixarem nitrogênio de maneira muito eficiente.

Algumas cianobactérias separam os dois processos temporariamente e outras produzem heterocistos para a fixação do N2. Heterocistos possuem paredes que impedem a passagem do O2, mas para a importância primordial, os que são fotossintéticos não possuem a capacidade de produzir oxigênio, apesar de terem a capacidade de produzir ATP, de acordo com Lawrence Bogorad (2000, p.261 - 262).

Outro local potencial para a nitrogenase nas plantas seria a mitocôndria, a qual tem um grande potencial respiratório, geração de ATP e que também assegura a remoção do oxigênio. Talvez isso seja análogo à proteção da respiração provida de organismos diazotróficos aeróbios como a *Azotobacter vinelandii.* A mitocôndria também fornece uma maior localidade para o cluster de íon de enxofre da biossíntese das plantas, o qual potencialmente poderia ser utilizado na nitrogenase como cluster metálico da biossíntese, como o ISC Fe-S cluster maquinário mitocondrial, que é bioquimicamente equivalente ao sistema NifUS nos microrganismos diazotróficos.

No caso dos cloroplastos, a síntese de glutamina está ligada à mitocôndria e é utilizada na organela para remover a amônia produzida pela fotorrespiração. Há, entretanto, possibilidade de desdobrar essa enzima para assimilar a amônia produzida pela nitrogenase (MøLLER; RATCLIFFE, 2013).

Portanto, a necessidade de focar em técnicas para a introdução do complexo genético no interior de organelas, a principal, no caso, seria o próprio cloroplasto da planta, é essencial e procura-se burlar a presença do oxigênio para que o complexo da nitrogenase trabalhe com eficiência.

3.1 NITROGENASE

A Nitrogenase é um complexo de enzima consistente de duas proteínas: o componente redutase, conhecido como “proteína Fe” e o componente catalítico conhecido como MoFe, ou ferro-molibdênio. Ambas são irreversivelmente danificadas pelo oxigênio e o processo catalítico requer 16 moléculas de ATP, o que foi dito antes e faz da enzima algo muito custoso em relação à energia, para cada mol de nitrogênio que é convertido para dois mols de amônia.

Essa despesa de energia está associada com o processo de transferência de elétrons para a redução do substrato. A nitrogenase também contém três clusters metálicos, um deles localizado dentro da proteína MoFe, denominado de FeMo-co, o qual é o mais complexo desses dois clusters metálicos conhecidos na biologia. O FeMo-co fornece o sítio de catálise para a redução do nitrogênio e contém molibdênio, ferro, enxofre e um átomo de carbono central homocitrato como uma porção orgânica [Mo Fe7 S9 C-homocitrate].

O restante dos dois clusters metálicos contém um cluster [4Fe-4S] na proteína de Fe e um cluster de P e um cluster [8Fe-7S] localizado na proteína MoFe. Esses dois clusters fornecem a transferência de elétrons conduzida pela proteína clusters Fe e P do cluster FeMo-co no seu sítio catalítico. Em vista dessa complexidade bioquímica, talvez não seja surpreendente que o grande número de genes nifs requeridos para o processo e função da nitrogenase (MøLLER; RATCLIFFE, 2013).

3.2 NÚMEROS DE GENES

Embora as funções dos de muitos genes nifs tenham sido definidas ao nível bioquímico, ainda é de grande dificuldade de definir precisamente o número de genes que podem ser requeridos para suportar a atividade da nitrogenase na mitocôndria e nos cloroplastos. Embora o comum sejam 6 genes, compreendendo componentes estruturais e biossintéticos, que estão presentes no genoma dos microrganismos diazotróficos, o complemento de genes nifs varia consideravelmente entre uma vasta gama filogenética de espécies fixadoras.

Essa variabilidade do gene nif é provavelmente um reflexo do variado estilo de vida fisiológico dos microrganismos diazotróficos, mas também pode implicar nos conjuntos mínimos de genes nif que são complementados por contrapartidas interiores localizadas em outras partes do genoma. O repertório diverso dos genes nifs fornece indubitavelmente extensa quantidade de peças da biologia sintética para aperfeiçoar e projetar a fixação do nitrogênio (MøLLER; RATCLIFFE, 2013).

3.3 EXPRESSÃO DO GENE NifH NA PLANTA

Quatro genes nifs são requeridos para montar uma NifH fixadora de nitrogênio assim como em algumas bactérias. *Vinelandii ou Klebsiella pneumoniae*: nifH, nifM, nifU e nifS. Os genes nifU e nifS são produtos constituintes do cluster Fe-S ligados ao maquinário especializado na síntese de clusters do componente nitrogenase proteico. E são encontrados na maior parte dos microrganismos diazotróficos.

Para nosso conhecimento, a expressão recombinante nos cloroplastos de organismos oxigenados só foi obtida no microrganismo *C. reinhardtii* na substituição de algumas de suas funções. Também estuda-se o caso da expressão do complexo de genes nifs durante a biossíntese que ocorre durante a noite, pois no caso da *C. reinhardtii* a expressão do gene foi bem sucedida em períodos de ausência de luz, mesmo com o fato de que os genes da NifH como o nifU, nifS e nifM estarem parcialmente inativos foi surpreendente

3.4 OS 9 GENES E O PROMOTOR

Segundo os autores Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, (2013), A maior para da fixação biológica de nitrogênio é catalisada pela nitrogenase molibdênio dependente, uma enzima complexa componente de duas proteínas que contêm três clusters metálicos diferentes e que o mínimo de genes nifs identificados para a FBN da *Paenibacillus sp.* WLY78 é de 9. Esses autores também demonstraram que os genes nifs desse organismo estão organizados como um operon compreendido dos genes nifB, nifH, nifD, nifK, nifE, nifN, nifX, hesA e nifV, de

uma maneira que ambos estão sob controle de um promotor localizado no montante do nifB.

A fim de investigar os requerimentos para um microrganismo diazotrófico eles transferiram o nif cluster da *Paenibacillus* para uma *E. coli.* Conseguiram expressar os genes com o promotor nativo do nifB, o promotor T7. O estudo comprovou que é possível obter a Fixação Biológica de Nitrogênio em um organismo antes não fixador com o mínimo de 9 genes nifs.

DISCUSSÃO

De acordo com Møller e Ratcliffe (2013), abordar a oferta de nutrientes é de crítica importância para a produção agrícola e pesquisas realizadas dos últimos anos apresentaram oportunidades biotecnológicas para suprir a necessidade de nitrogênio na agricultura. A engenharia da simbiose em plantas leguminosas e a introdução do complexo nitrogenase são grandes e difíceis problemas, mas há o potencial de uma mudança radical na maneira do crescimento das plantações na agricultura.

A complexidade das estratégias da engenharia a nível molecular é o grande obstáculo e, devido a isso, é improvável que haja soluções genuínas durante alguns anos ainda por vir, até mesmo nos próximos 20 anos. Entretanto, isso presume que a máxima fixação de nitrogênio é requerida e em algumas instâncias, até mesmo um pequeno aumento dela seria benéfico. Também é possível que os avanços tecnológicos possam entregar baixos níveis de fixação de nitrogênio dentro de um espaço de tempo curto e as fundações do nosso conhecimento estão num período de iniciar estratégias e é fato que as pesquisas já estão em andamento. Sem dúvida, todas as abordagens terão seus desafios, mas deve-se ter cuidado para não permitir que o medo da complexidade desses sistemas limite a abordagem do problema da fixação biológica de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

CHRISTOU, P. Soybean and Other Glycine species. In: _____. Genetic Engineering and in Vitro Culture of Crop Legumes. Lancaster: Technomic Publ. Co., 1992

FILOSO, S.; MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W.; BOYER, E. W.; DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. Biogeochemistry, Dordrecht, v. 79, n. 1-2, p. 61-89, May 2006.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. atual. ampl. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

ALCANTARA, R. M. C. M. de; ARAÚJO, A. P. de; XAVIER, G. R.; ROCHA, M. de M.; RUMJANEK, N. G. Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos. Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. 2009

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X and Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? Trends Microbiol 17:458-466.

Bauer WD (1981) Infection of legumes by rhizobia. Annu Rev Plant Physiol 32:407-449.

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R and Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. Ann Microbiol 60:579-598.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.22, pp. 881-896,1987.

PERANI, L. et al. Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.68, pp. 566-570, 1986.

SANTARÉM, E. R. (2000). Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. Revista de Ciência e Tecnologia, 15(15), 81-90.

Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR: Mechanism of Modependent nitrogenase. Ann Rev Biochem 2009, 78:701-722.

Burgess BK, Lowe DJ: Mechanism of molybdenum nitrogenase. Chem Rev 1996, 96:2983-3012.

Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC et al.: Solutions for a cultivated planet. Nature 2011, 478:337-342.

Mueller ND, Gerber JS, Johnston M, Ray DK, Ramankutty N, Foley JA: Closing yield gaps through nutrient and water management. Nature 2012, 490:254-257.

Rubio LM, Ludden PW: Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Ann Rev Microbiol 2008, 62:93-111.

Hu Y, Ribbe MW: Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. J Biol Chem 2013, 288:13173-13177.

Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR: Electron transfer in nitrogenase catalysis. Curr Opin Chem Biol 2012, 16:19-25.

Poole RK, Hill S: Respiratory protection of nitrogenase activity in Azotobacter vinelandii—roles of the terminal oxidases. Biosci Rep 1997, 17:303-317.

Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mu¨ hlenhoff U: The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res 2012, 1823:1491-1508.

Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA: Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. Plant Cell 2004, 16:2048-2058.

Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, et al. (2013) A Minimal Nitrogen Fixation Gene Cluster from Paenibacillus sp. WLY78 Enables Expression of Active Nitrogenase in Escherichia coli. PLoS Genet 9(10): e1003865. doi:10.1371/journal.pgen.1003865