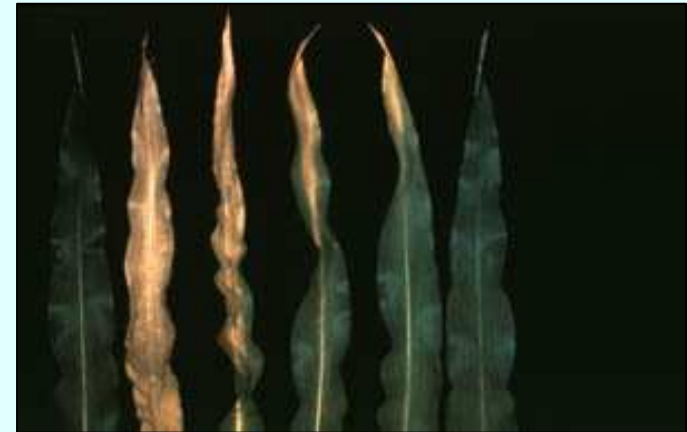
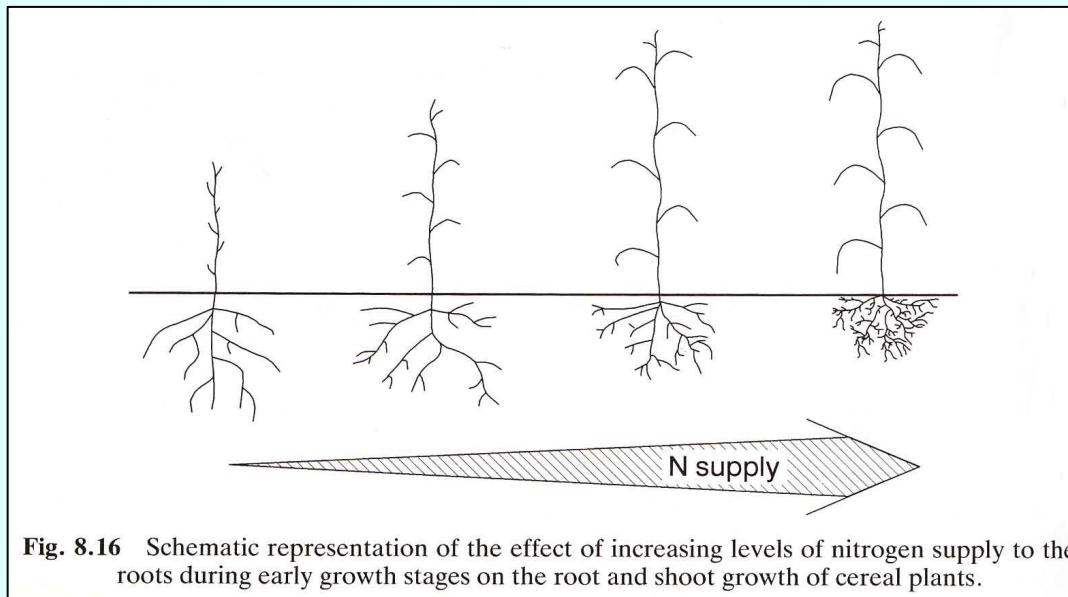


Dusík

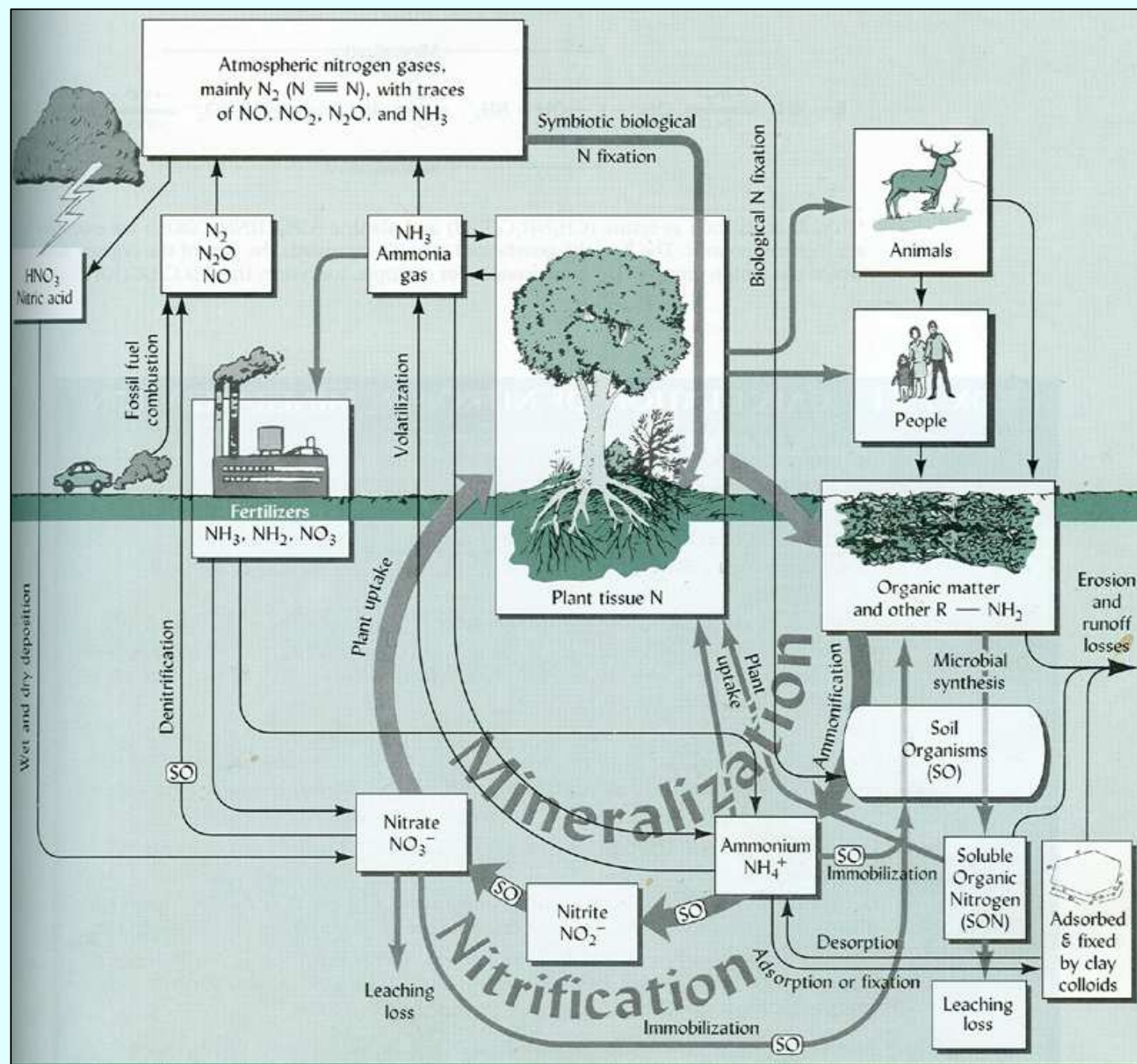
- nejdůležitější minerální živina (2-5% SH)
- dostupnost dusíku ovlivňuje:
 - produkci biomasy a její distribuci
 - ontogenetický vývoj
 - hormonální rovnováhu (cytokininy, ABA)
 - rychlost fotosyntézy a rovnováhu metabolismu C a N
 - transport látek v rostlině
 - obsah prvků a metabolitů v rostlině



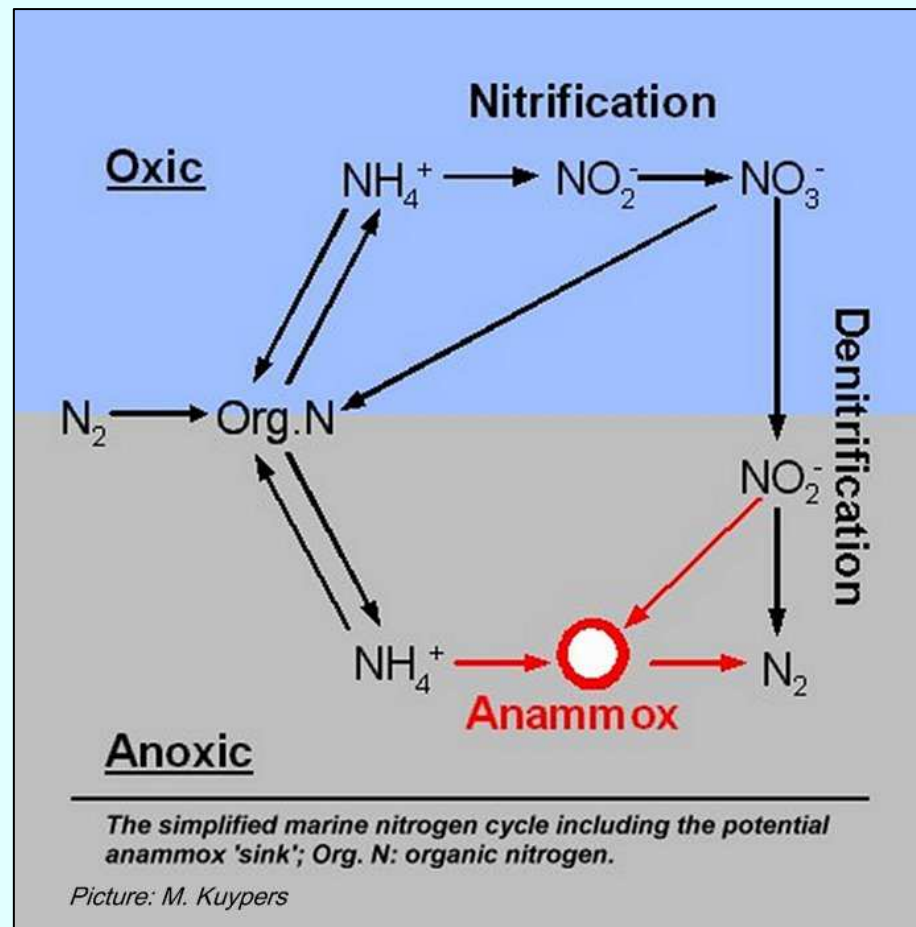
Texty výživy rostlin
MZU v Brně
http://www.af.mendelu.cz/external/relay/agrochem/multitexty_2/html/okopaniny/A_index_okopaniny.htm

Marschner 1995

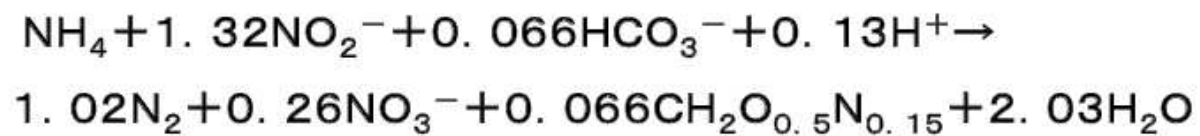
Zdroje dusíku v přírodě:



ANAMMOX - nedávno objevená část N cyklu

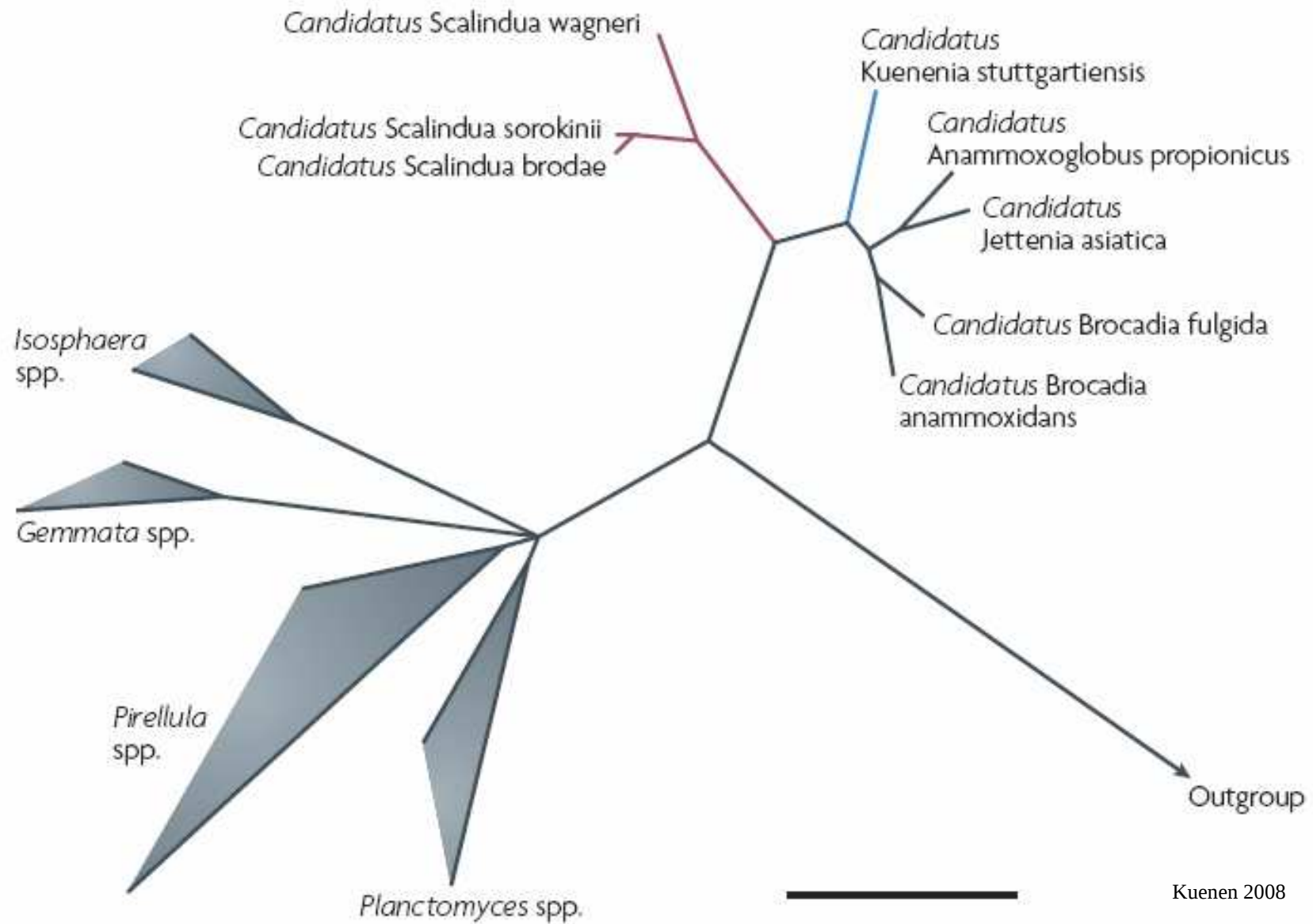


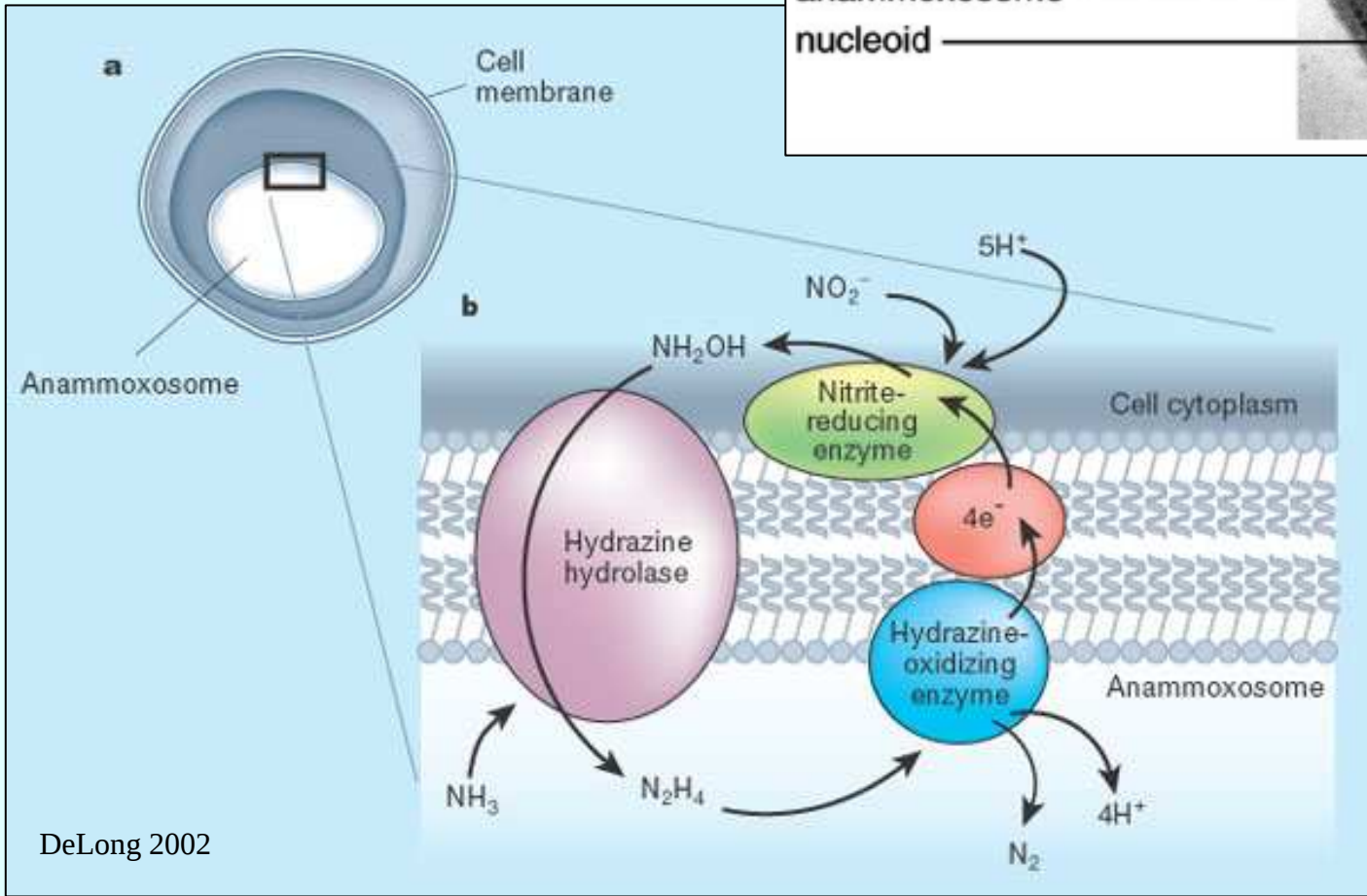
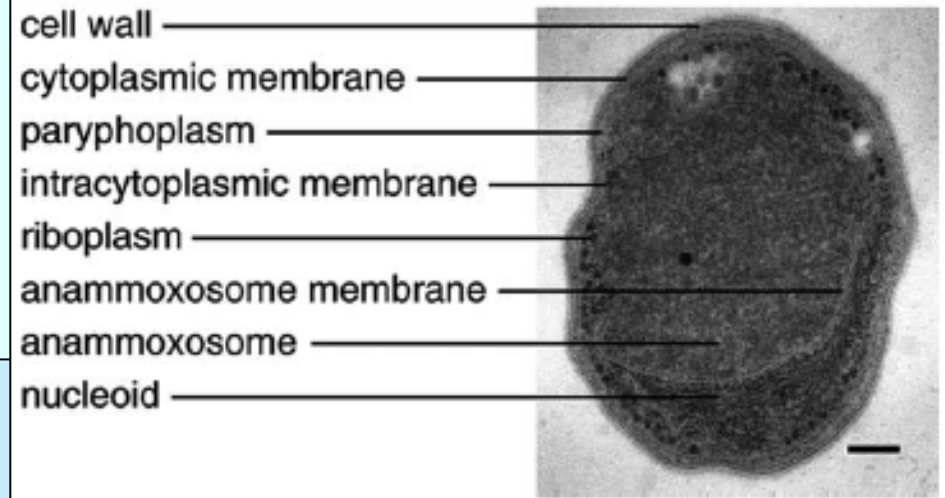
Kuypers et al. 2003



Murakami 2006

Anammoxové bakterie (*Planctomycetes*)





DeLong 2002

van Niftrik et al. 2004

Zdroje N pro rostliny:

NO_3^-

NH_4^+

organický dusík ?

aminokyseliny ?

močovina ?



Význam org. dusíku - aminokyseliny?

- dostupnost + příjem + metabolismus

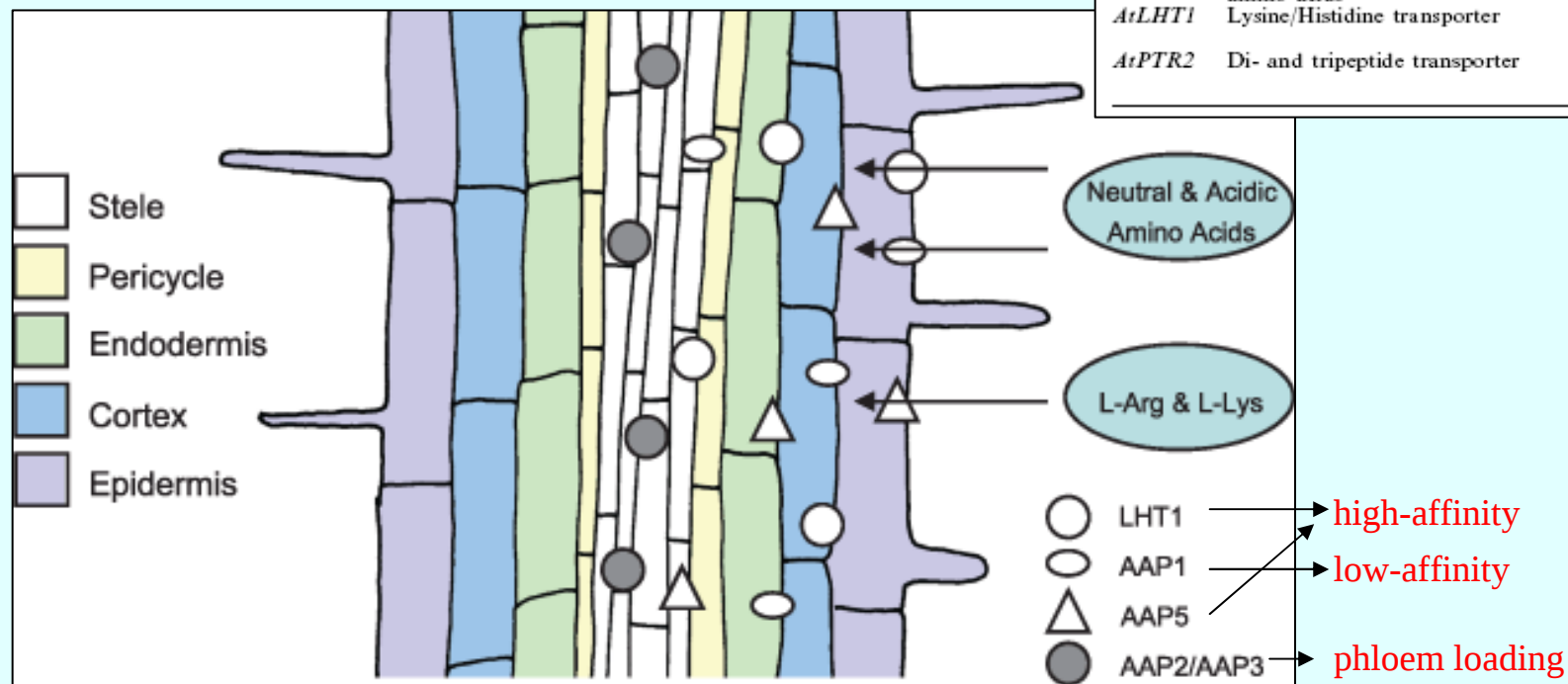


Table 1. Organic nitrogen transporter genes shown to be expressed in roots of *Arabidopsis thaliana*.

Gene	Type of Transporter	Source
<i>AtAAP3</i>	Low affinity general amino acid transporter	Fischer et al. 1995
<i>AtAAP5</i>	Low affinity general amino acid transporter	Fischer et al. 1995
<i>AtAAP6</i>	High affinity neutral/acidic amino acid transporter	Rentsch et al. 1996
<i>AtProT1</i>	Proline transporter	Rentsch et al. 1996
<i>AtProT2</i>	Proline transporter	Rentsch et al. 1996
<i>AtCAT1</i>	High affinity transporter of basic amino acids	Frommer et al. 1995
<i>AtLHT1</i>	Lysine/Histidine transporter	Chen and Bush 1997
<i>AtPTR2</i>	Di- and tripeptide transporter	Steiner et al. 1994

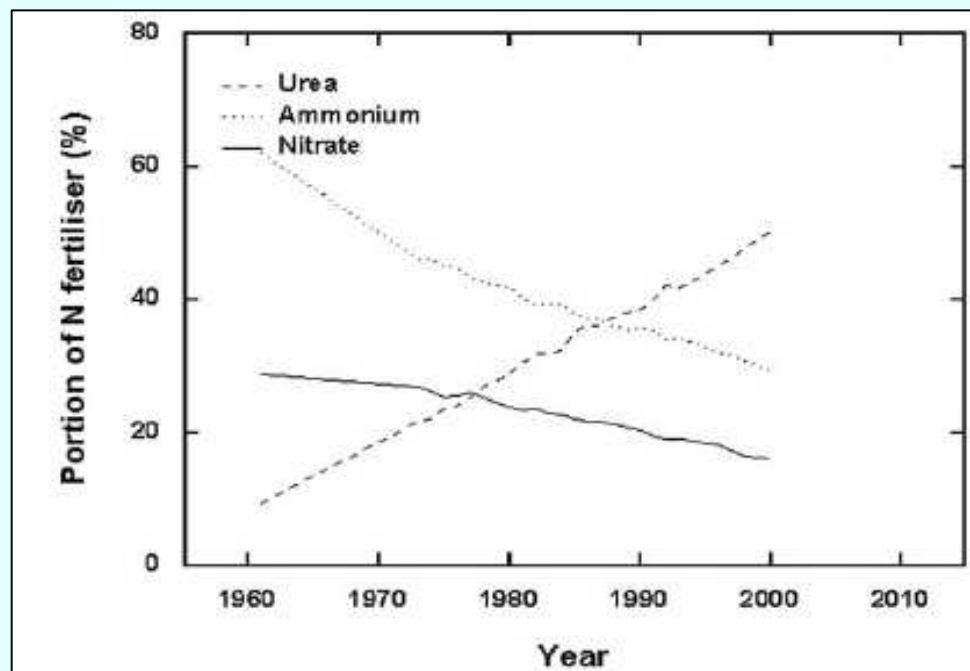
Nasholm 2001

Nasholm 2009

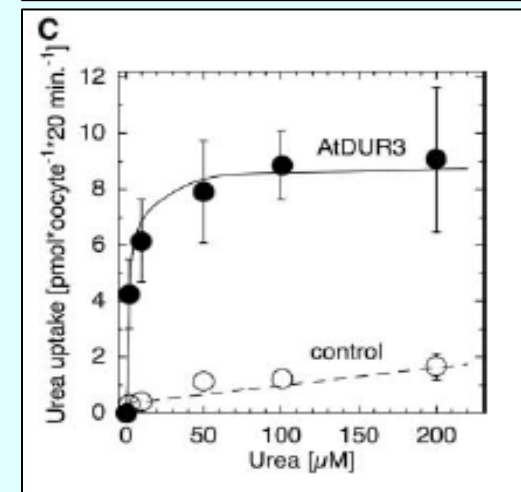
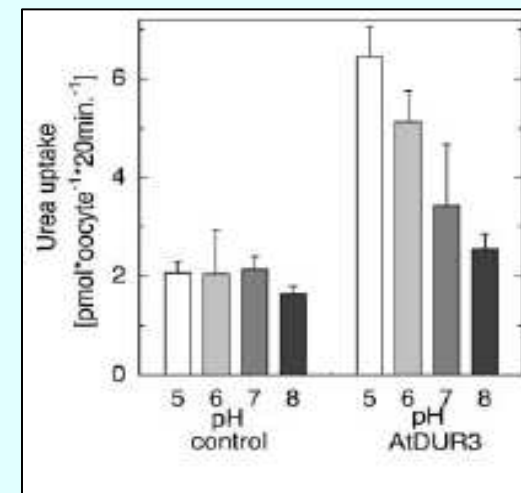
? rostliny x mikroorganismy

? aminokyseliny x anorganické formy N

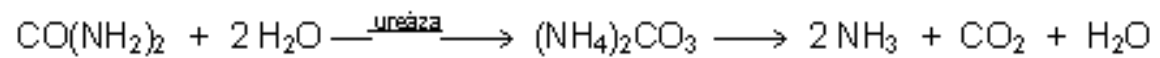
Význam org. dusíku - močovina?

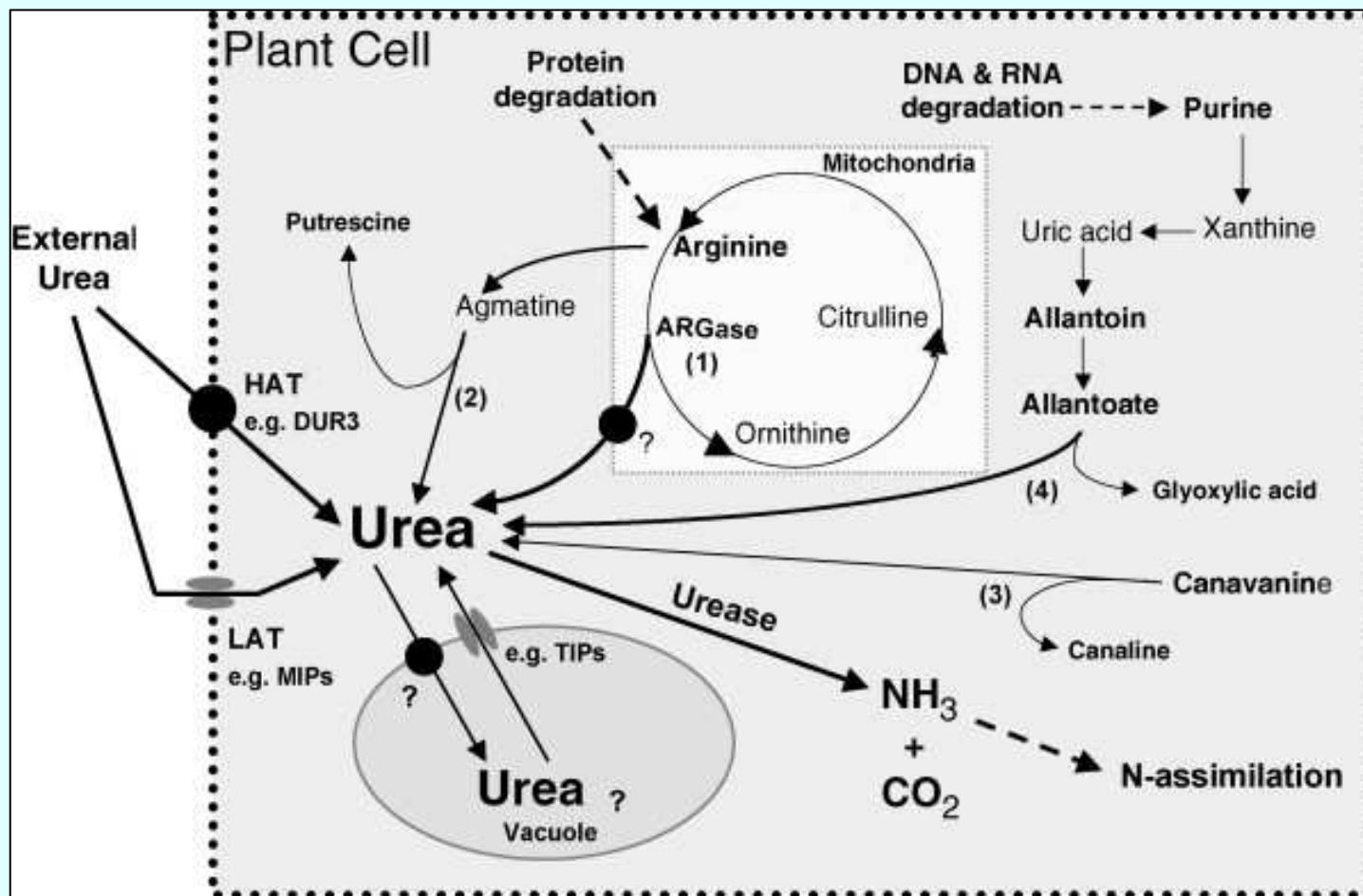


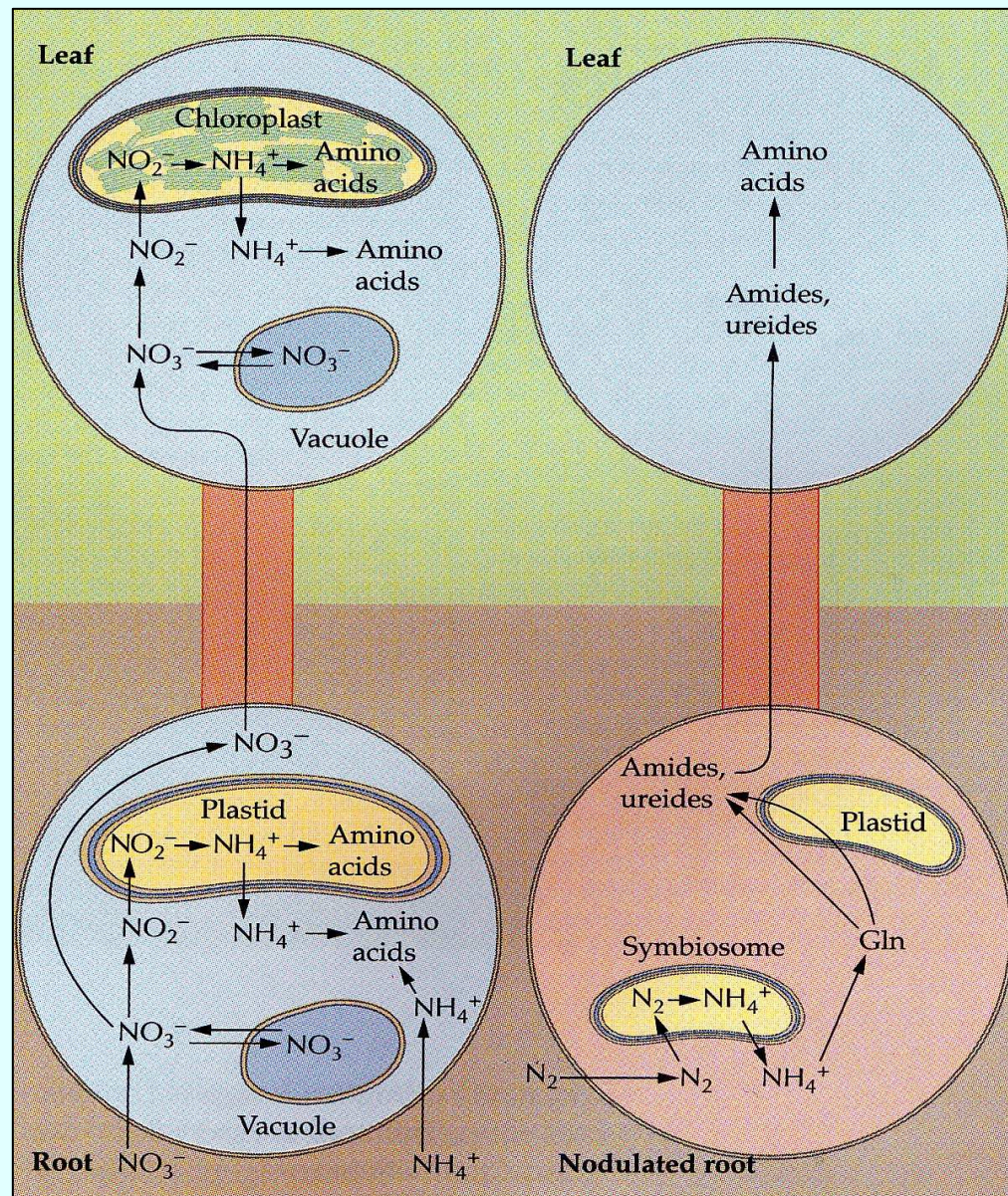
Miller 2004



Liu 2003







Buchanan 2000

Příjem NO_3^-

- symportem s 2 H^+

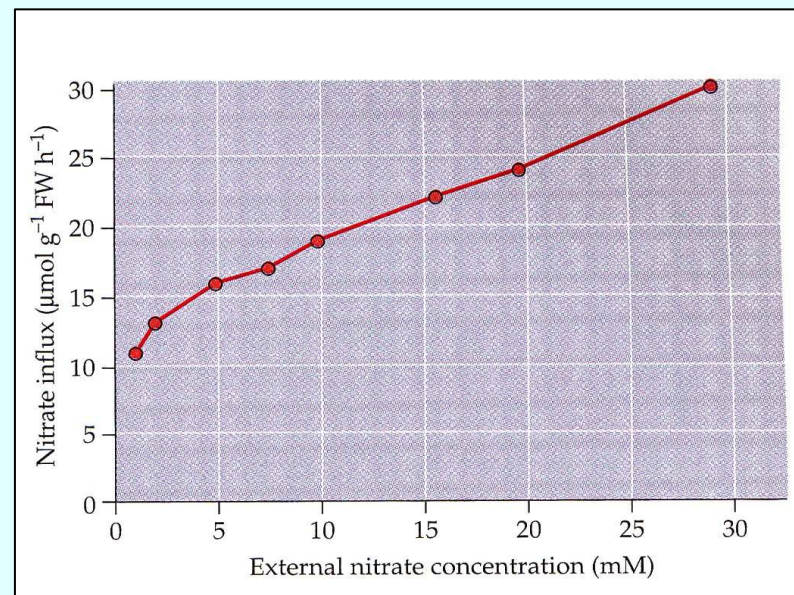
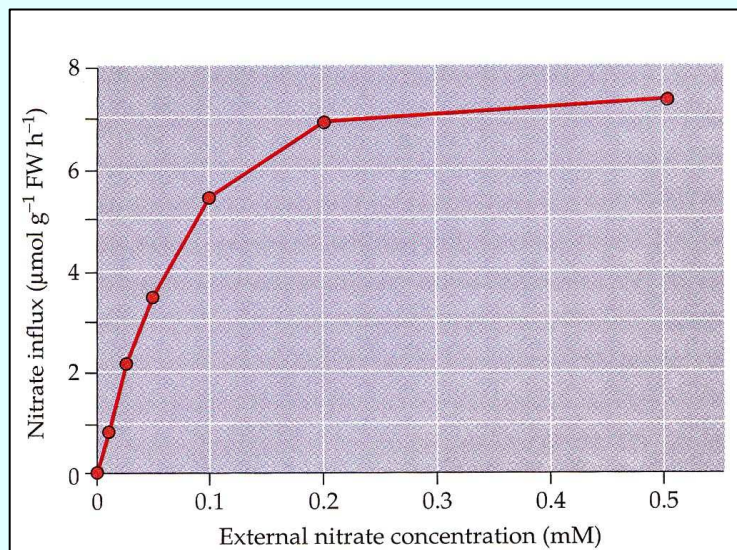
HATS (high-affinity transport system)

(saturován při koncentraci kolem 0,2-0,5 mM,
 $K_m = 10$ až $100 \mu\text{M}$; $V_m = 2-9 \mu\text{mol/g FW h}$)

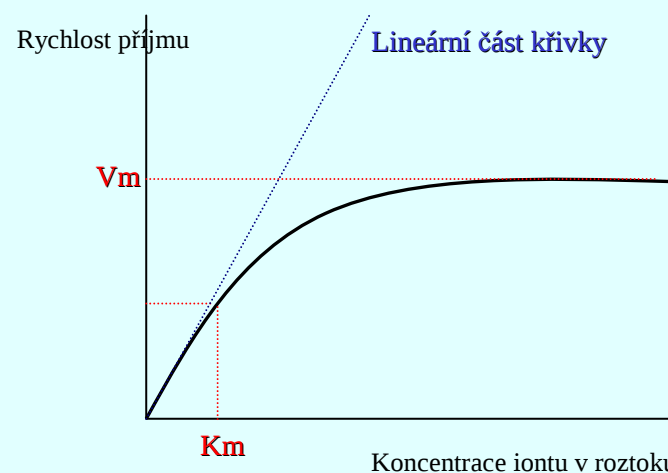
↙ **CHATS** (constitutive)
↘ **IHATS** (inducible)

LATS (low-affinity transport system)

$K_m = 170$ až $25\,000 \mu\text{M}$; $V_m = 8$ až $700 \mu\text{mol/g FW h}$)

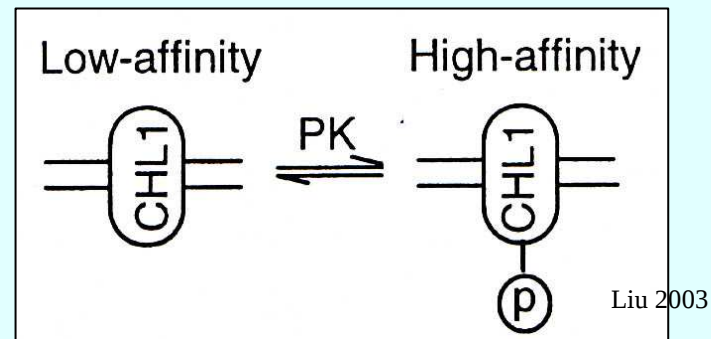
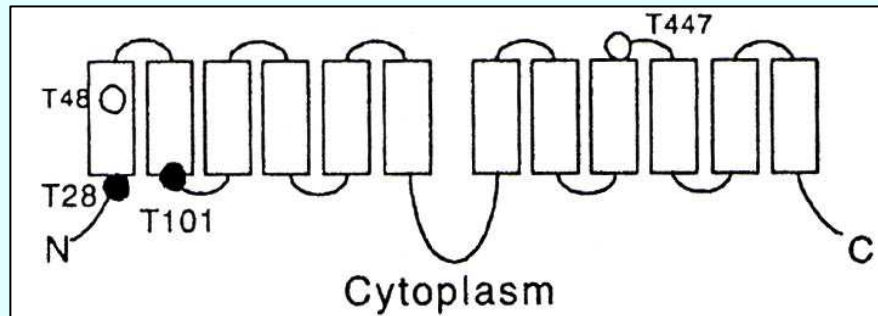


Buchanan 2000



doposud izolovány geny pro **dvě skupiny transportérů**:
(především *Arabidopsis*)

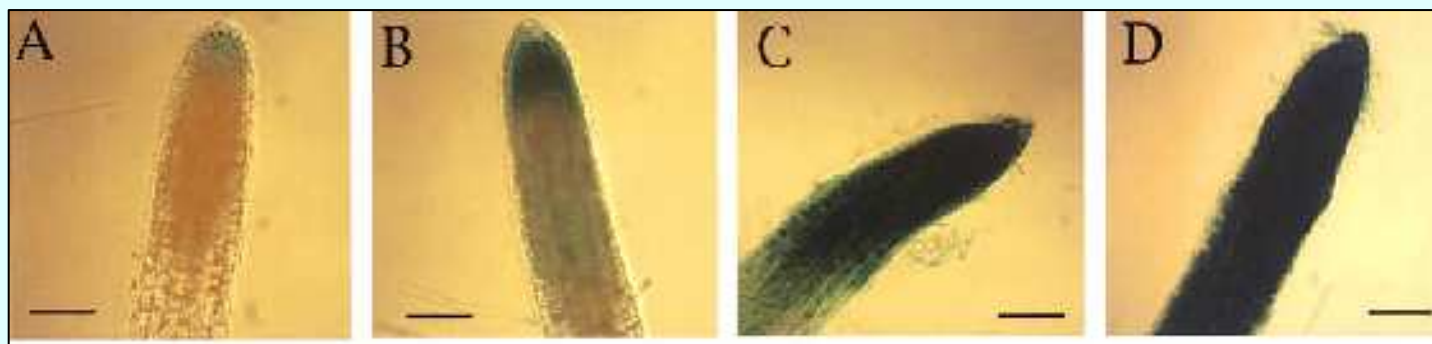
NRT1;1-2 – transportéry s duální afinitou (NRT1;1) a LATS (NRT1;2)



CHL1 = AtNTR1
(*Arabidopsis thaliana* resistentní ke chlorátu ClO_3^-)

Regulace exprese NTR1;1 prostřednictvím auxinu:

CHL1 : : *GUS* konstrukt u *Arabidopsis*



kontrola

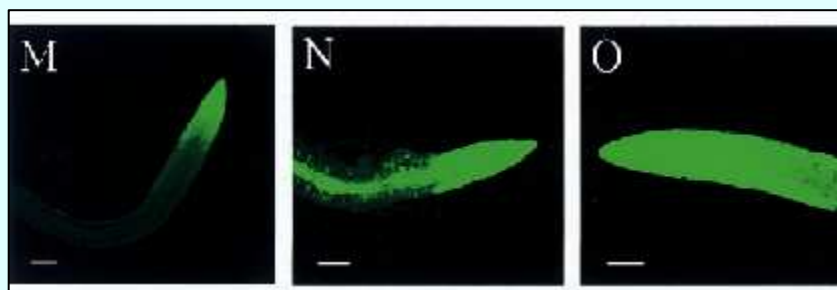
1 μM IAA 6h

1 μM IAA 12h

10 μM IAA 12h

Guo et al. 2002

CHL1 : : *GFP* konstrukt



wild-type

mutanty s nadprodukcí IAA

NRT2;1-7 - transportéry HATS

AtNTR2;1 + AtNTR2;2 iHATS

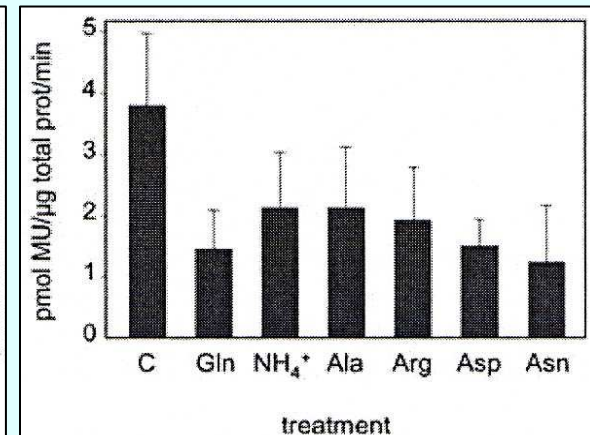
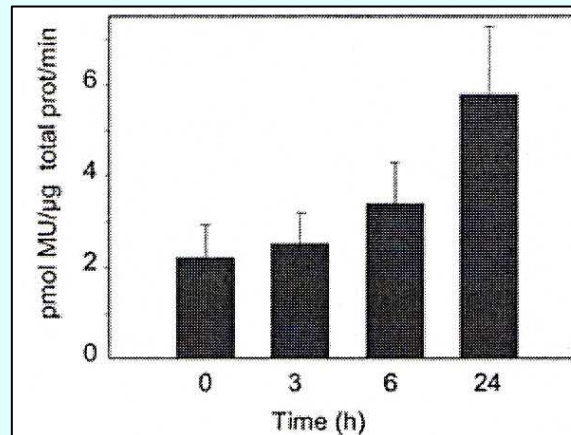
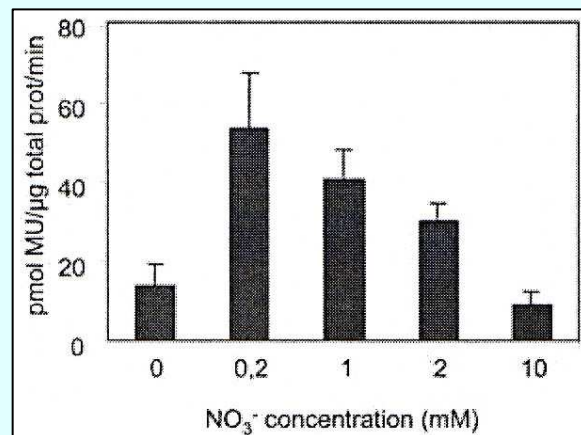
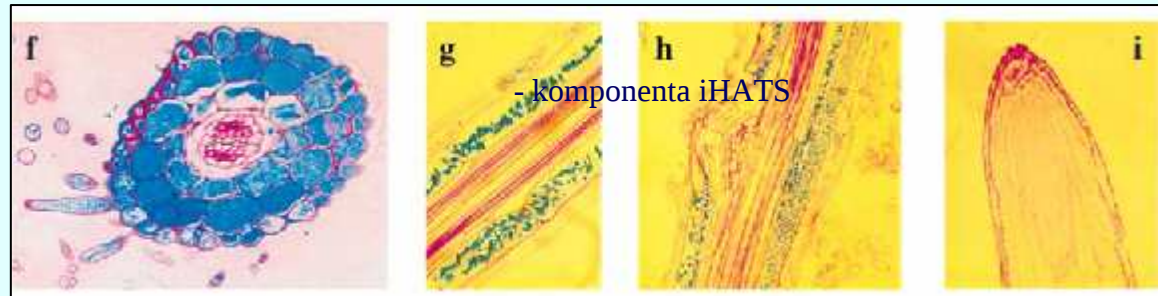
AtNRT2;4

AtNRT2;3 + AtNRT2;6 a AtNRT2;7.....cHATS

AtNRT2;5

NTR2;1 u Arabidopsis

NTR2;1 : : GUS konstrukt u *Arabidopsis*



Regulace příjmu NO_3^-

- aktuální stav rostliny, rychlost růstu, fáze ontogenetického vývoje
- vnější podmínky (světlo, teplota, chemické a fyzikální podmínky rhizosféry)
- okamžitá rychlost příjmu regulována negativní zpětnou vazbou (koncentrace produktů asimilace dusíku: nitrit, AK, aminy)
- fytohormony (auxin, cytokininy prostřednictvím aktivity NR)

Příjem NH_4^+

- příjem uniportem za současné acidifikace rhizosféry

- HATS

($K_m = 10$ až $70 \mu\text{M}$)

multifázní příjem – existence více transportních systémů

identifikovány některé transportéry:
AtAMT1 (Arabidopsis)

u rýže pak blíže popsána regulace:

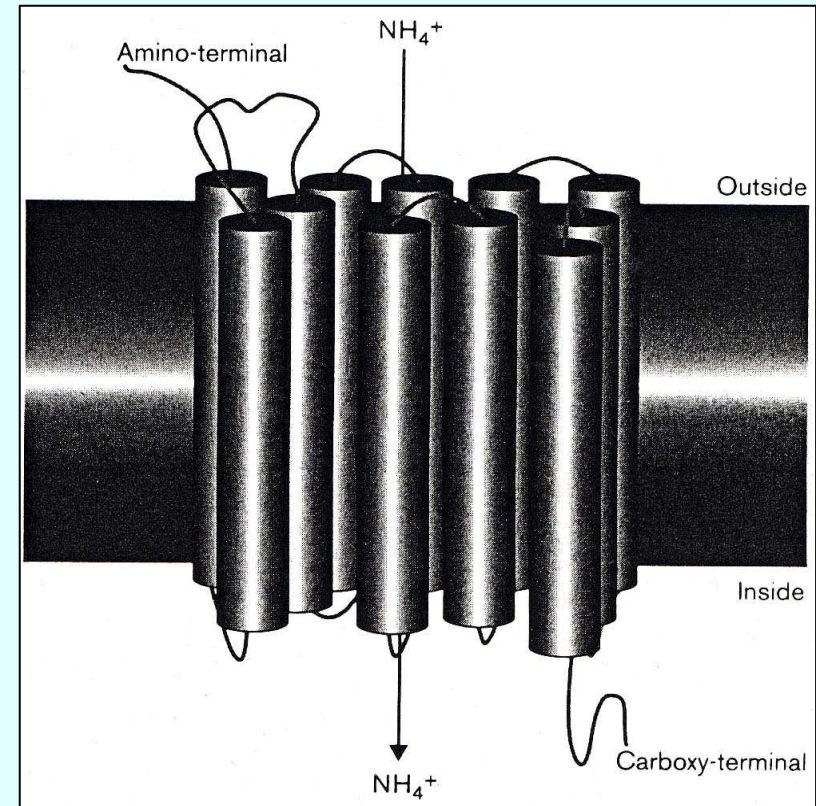
OsAMT1;1

OsAMT1;2

OsAMT1;3

LATS - iontové kanály pro K^+ ?

AKT1

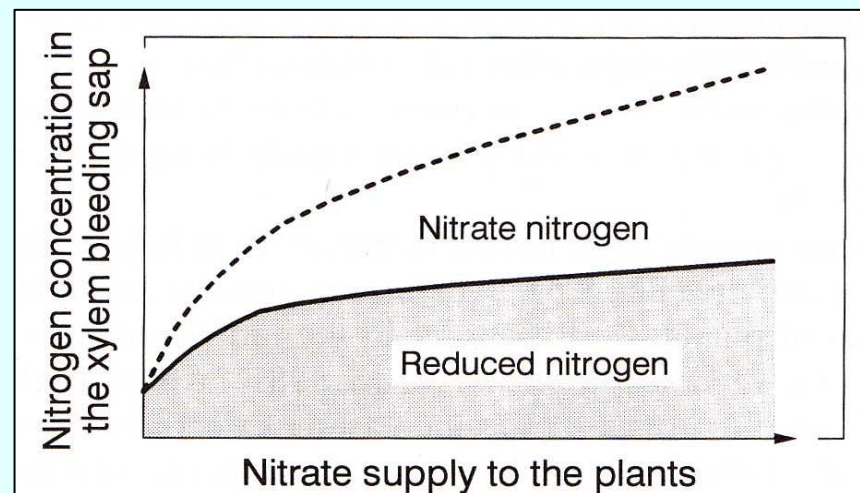


Comparison of bare and hydrated ion radii for NH_4^+ and some other cations (from [12])

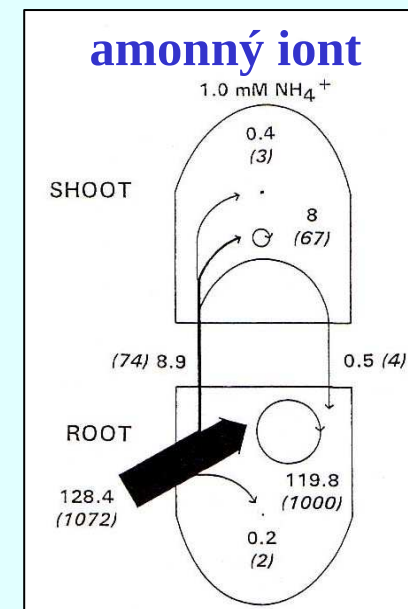
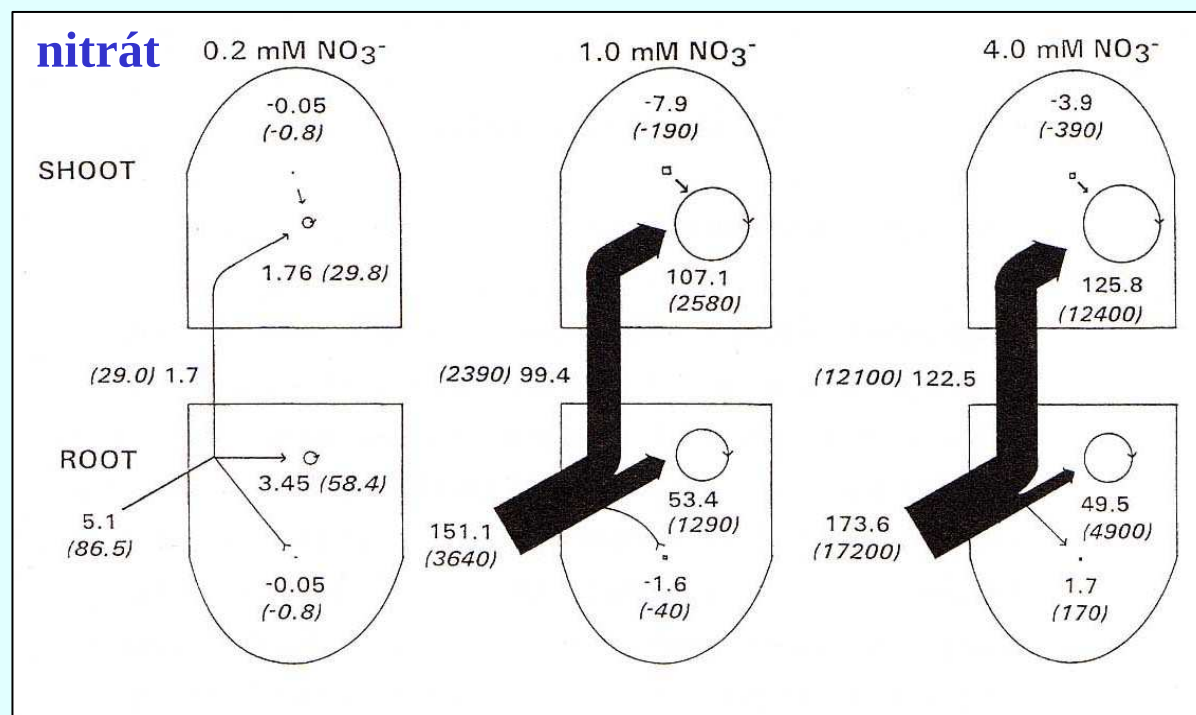
Ion	Bare ion (nm)	Hydrated ion (nm)
H_3O^+	0.115	0.28
Li^+	0.094	0.382
Na^+	0.117	0.358
NH_4^+	0.148	0.331
K^+	0.149	0.331
Rb^+	0.163	0.329
Cs^+	0.186	0.329

Transport dusíku v rostlině:

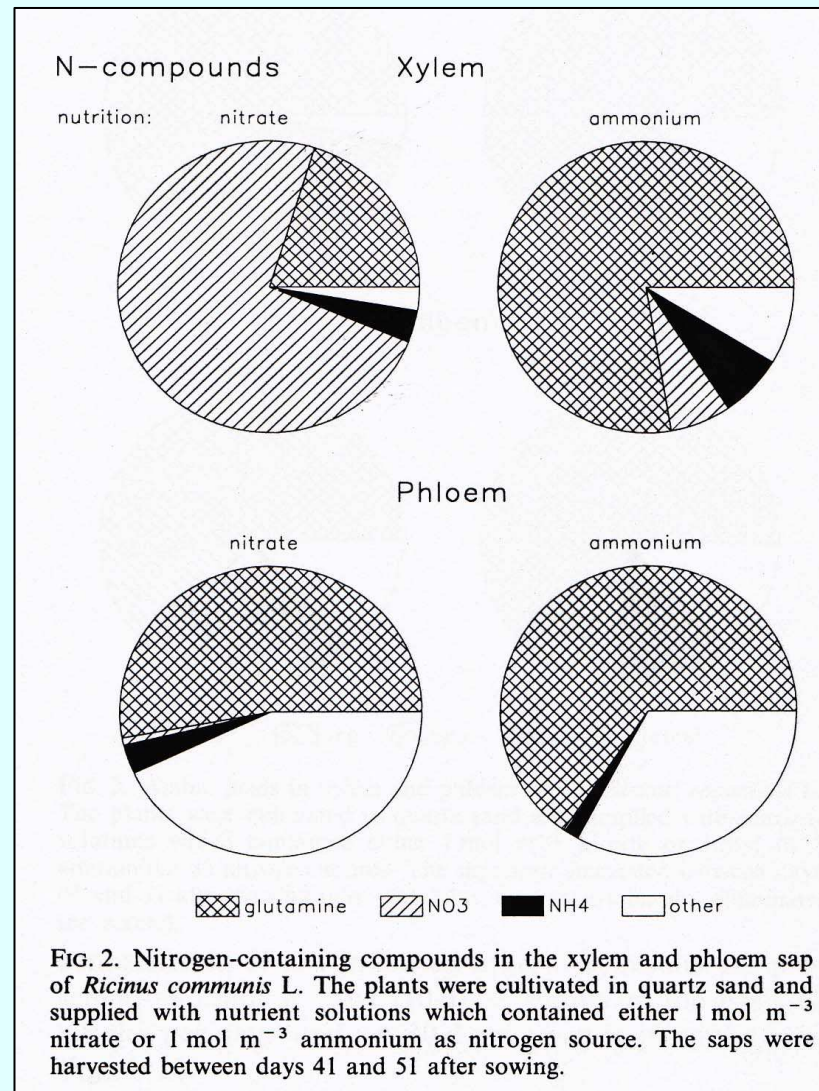
- amonný iont asimilován přednostně v kořenech
- nitrát redukován v kořenech i v nadzemní části (v závislosti na dostupnosti nitrátu)



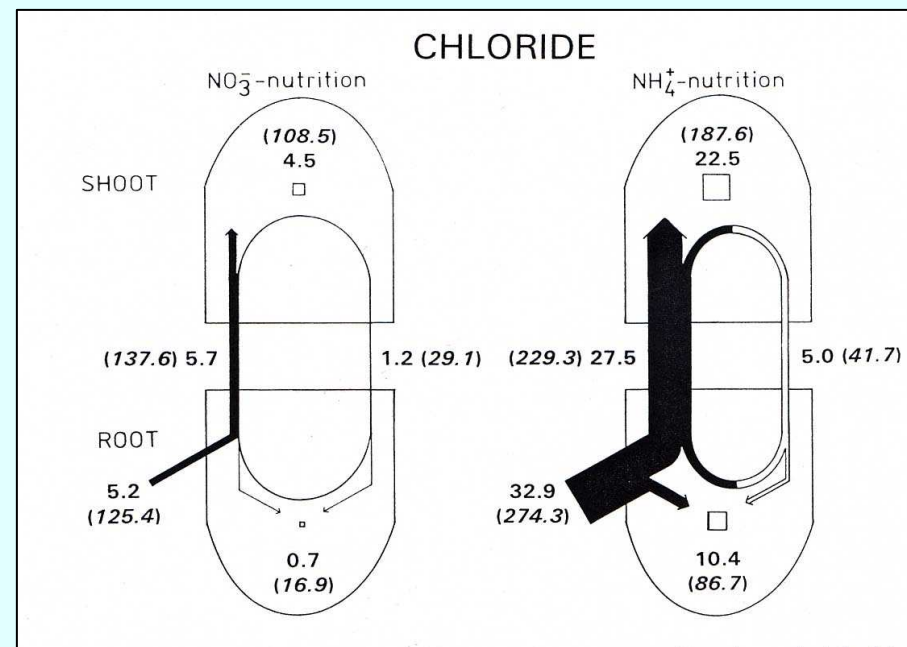
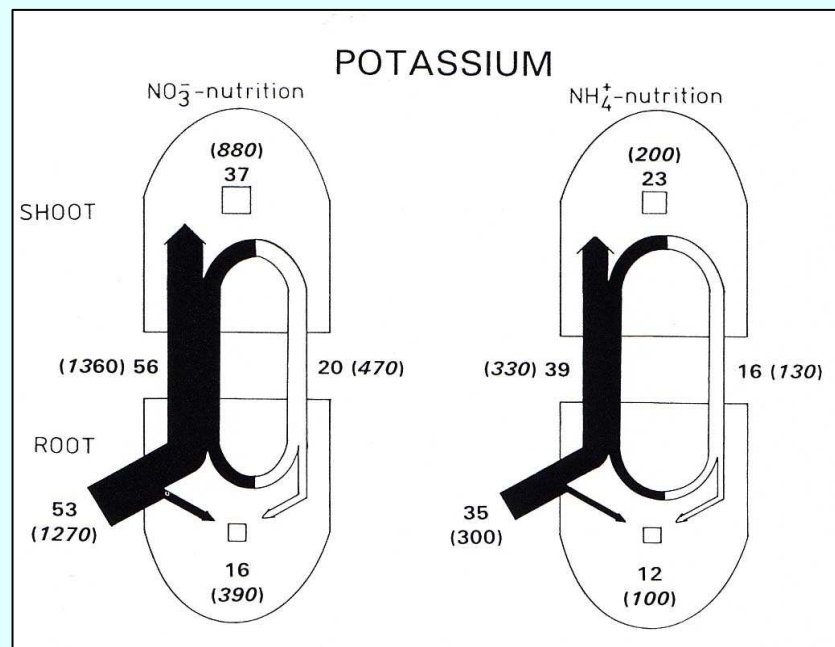
Marschner 1995



Peuke 2000



Peuke a Jeschke 1993



Peuke a Jeschke 1993

Nitrát versus amonný iont:

- dostupnost v prostředí x preference rostliny

NH_4^+ tolerantní:

rýže, ostřice

borůvky, brusinky, vřes

klimaxové jehličnany (smrk, tsuga)

některé krytosemenné dřeviny

mírného pásma (dub, buk, habr)

eucalypty

NH_4^+ citlivé:

rajče, brambor, fazol, ječmen

pionýrské dřeviny (topol)

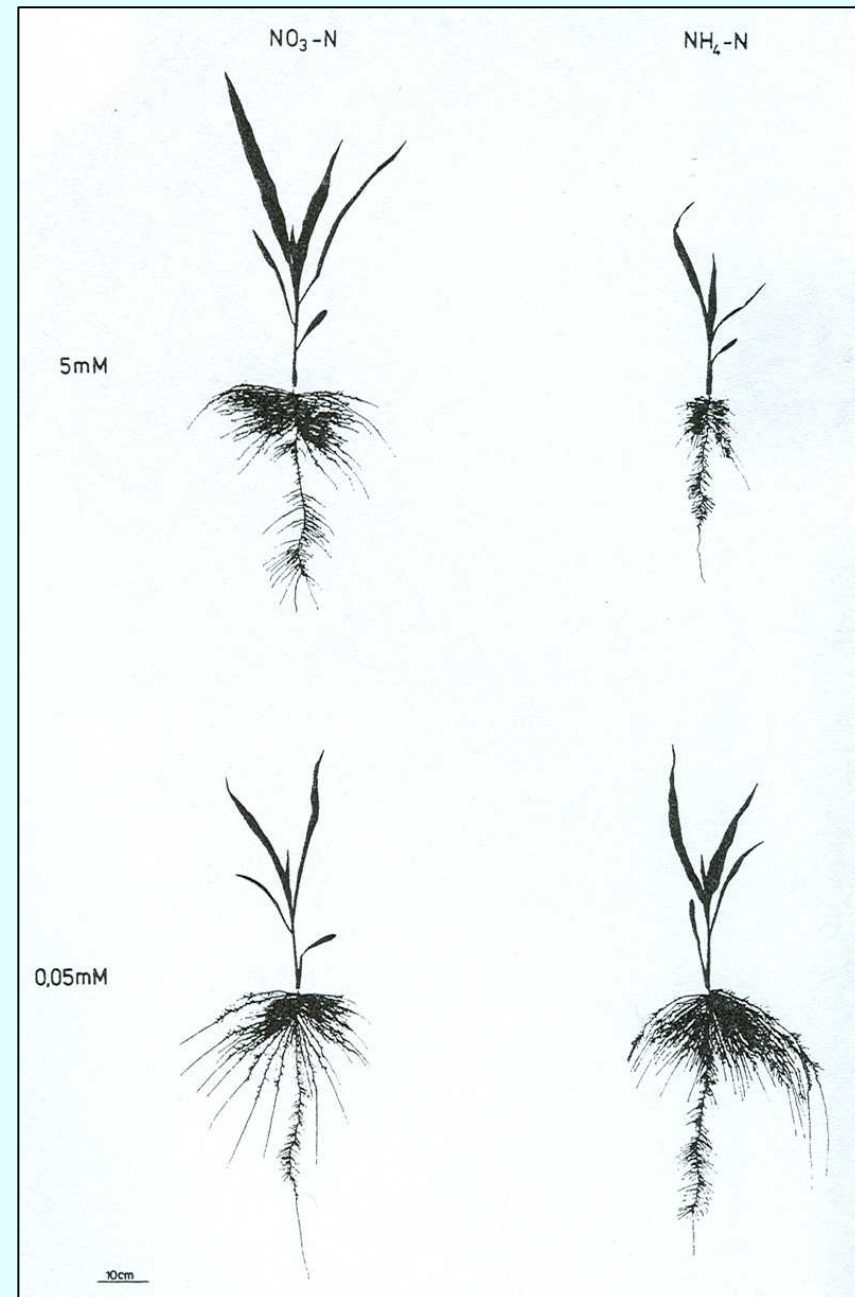
- toxicita amonného iontu

růst, distribuce biomasy

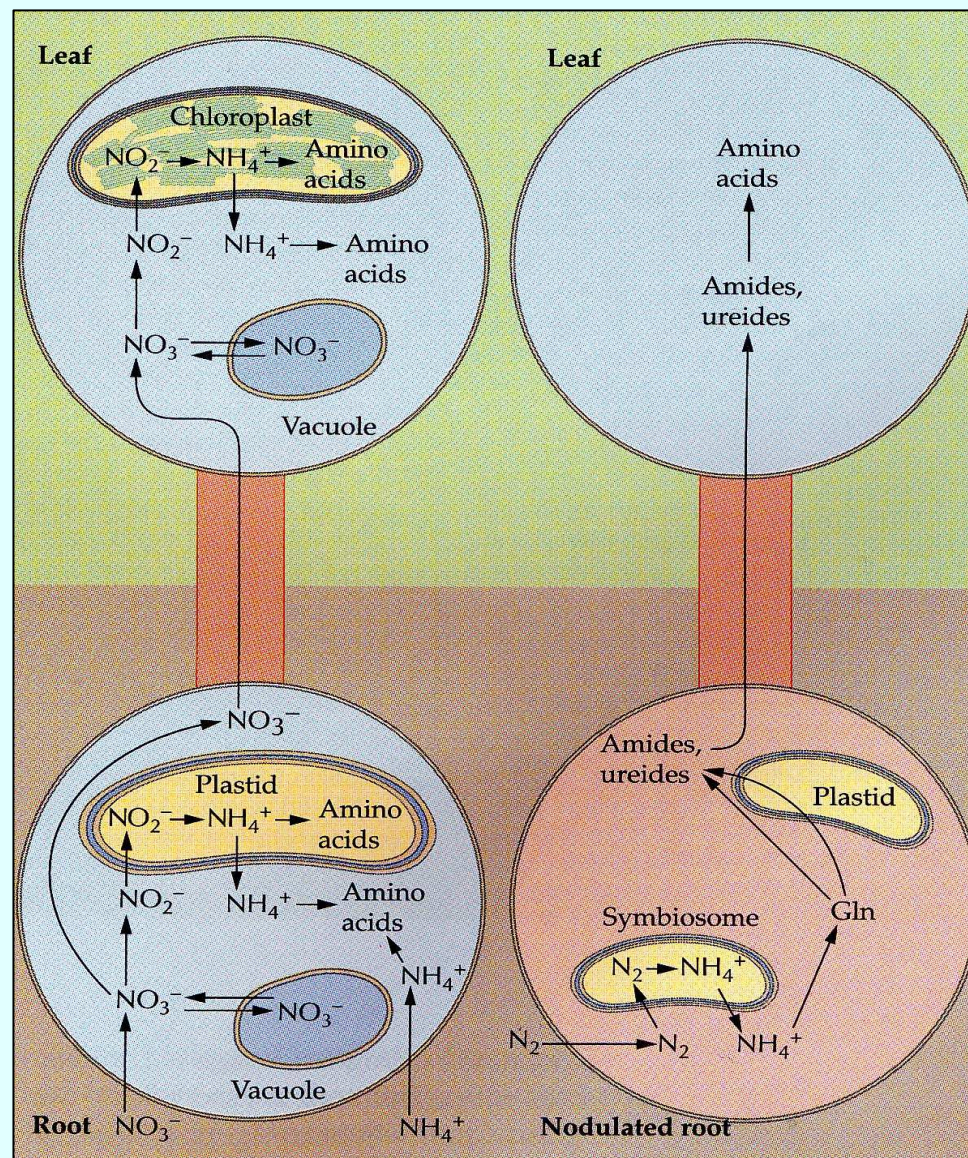
příjem ostatních živin

transport látek v rostlině

Gerendas 1997



Zpracování dusíku v rostlině:



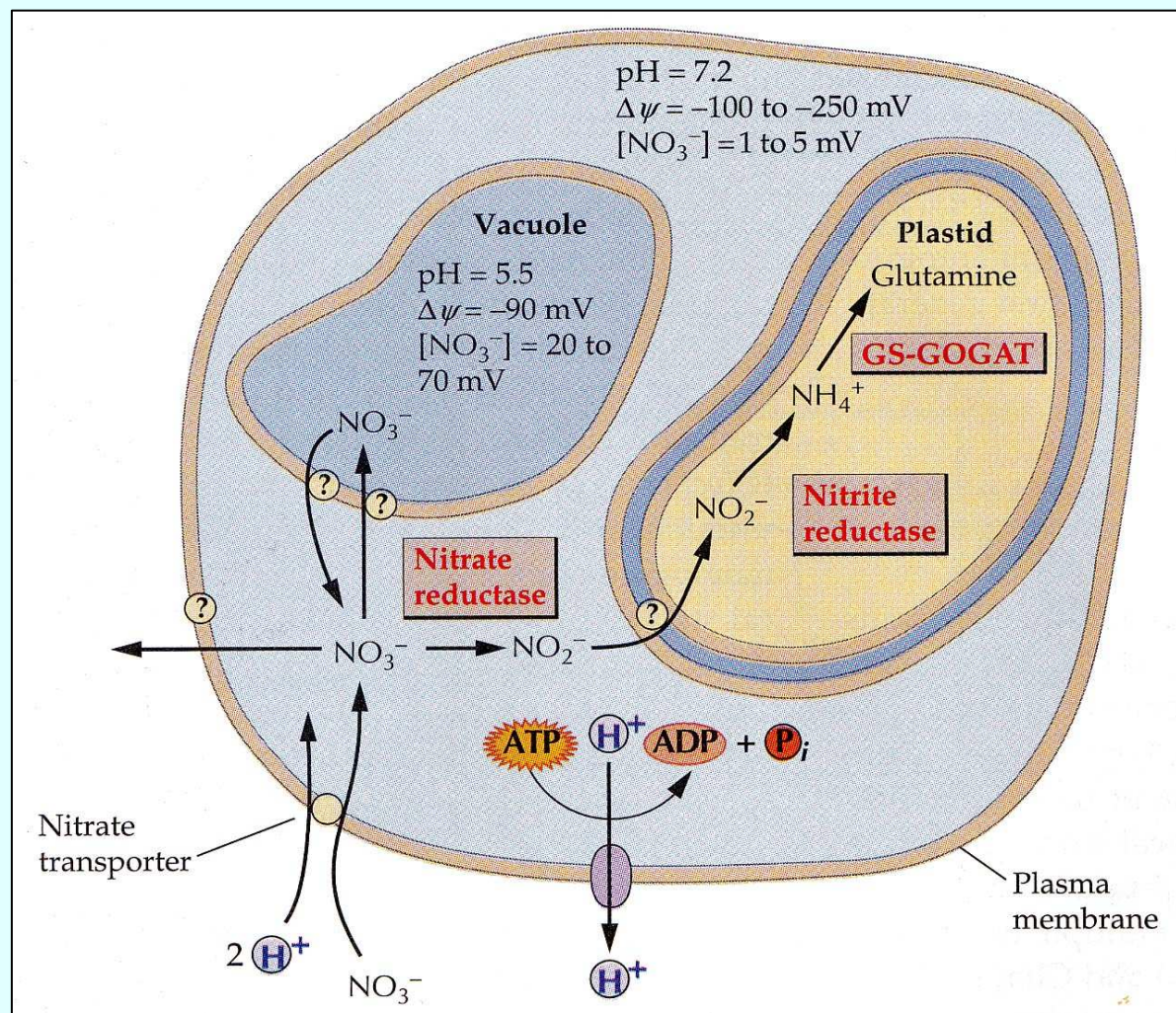
Buchanan 2000

Redukce nitrátu:

- probíhá v nadzemní i podzemní části
(v závislosti na rostlinném druhu a
aktuálních ekologických podmínkách)



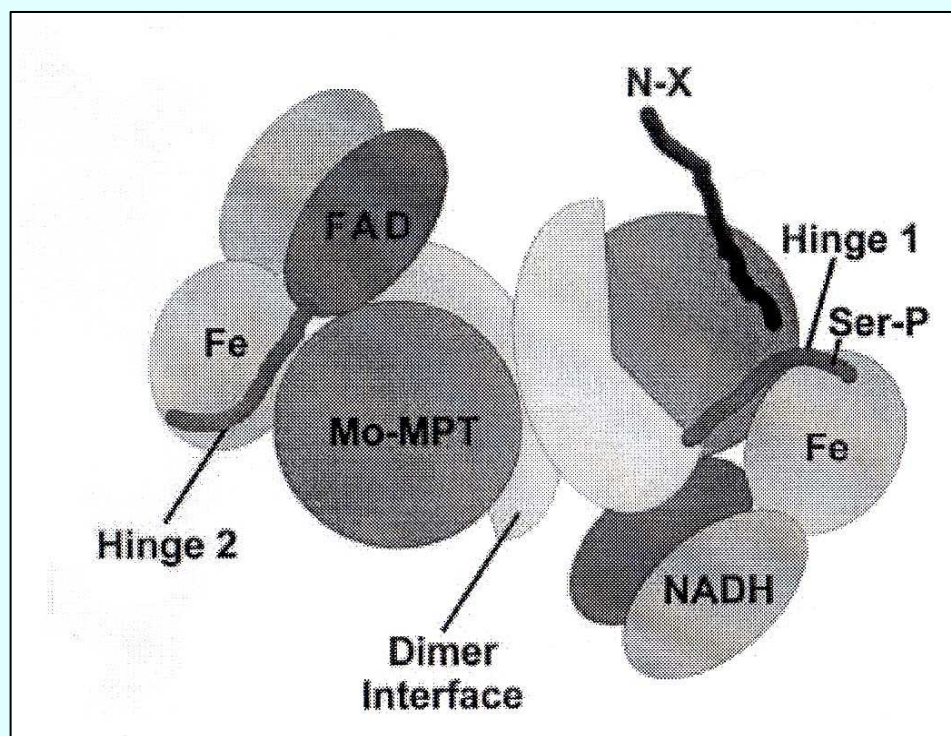
(mocenství N se mění z +5 na -3)



Redukce nitrátu na nitrit:



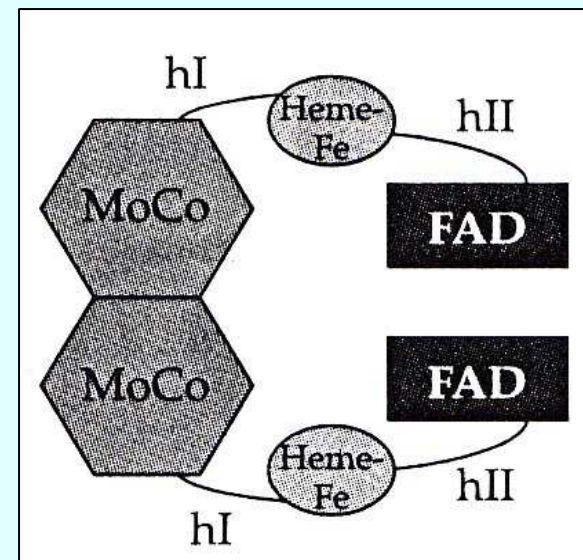
- probíhá v cytoplasmě
- reakce katalyzována **nitrátreduktázou (NR)**



Campbell 1999

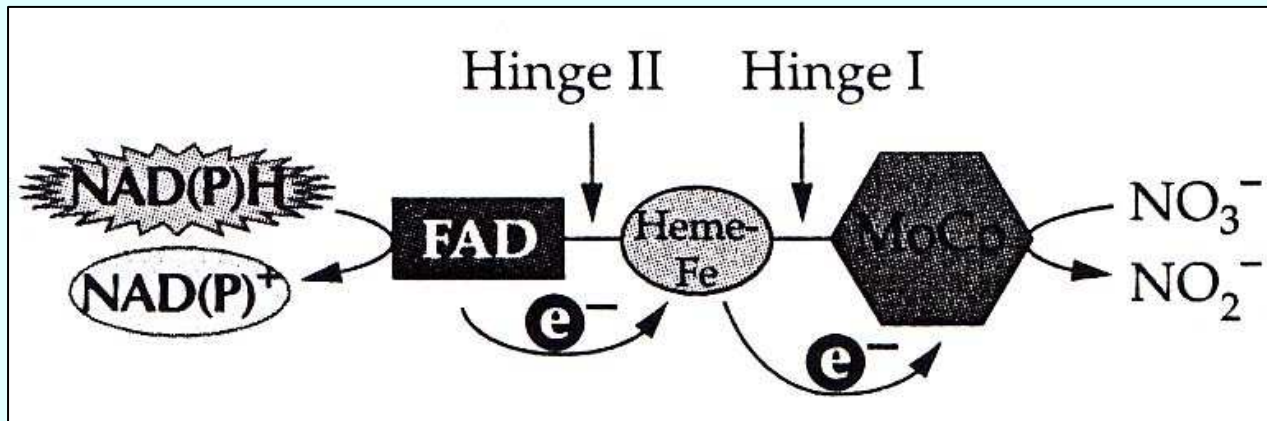
Nitrátreduktáza (NR, EC 1.6.6.1-3)

- cytoplasmatický homodimer
- monomer tvořen polypeptidem (100 kDa) a 3 prosthetickými skupinami:
 - FAD
 - Fe-hem
 - molybdenový kofaktor (MoCo)

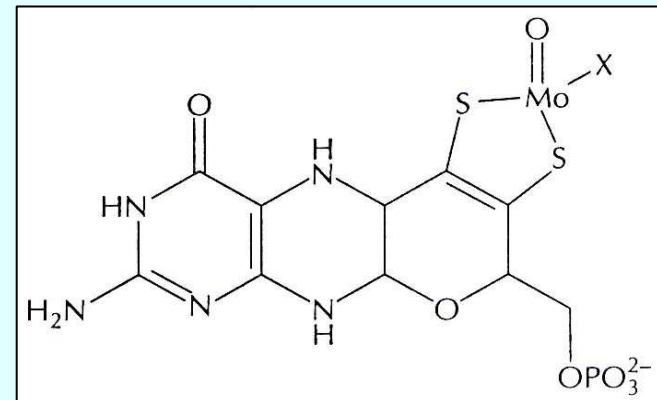


Buchanan 2000

- zajišťuje transport elektronů z NADH do vazebného místa pro nitrát („down hill“ transport)



Buchanan 2000



Regulace aktivity nitrátreduktázy:

- aktivita NR regulována celou řadou faktorů na mnoha úrovních (klíčový enzym asimilace N, toxicita NO_2^-) – nutná koordinace mezi požadavkem rostliny, dostupností nitrátu a dostupností sacharidů
- regulace: regulace transkripce a translace (dlouhodobá odpověď)
posttranslační modifikace (okamžitá regulace aktivity, degradace)
- přítomnost konstitutivní a indukovatelné formy NR

1. regulace transkripce a translace (hodiny, dny)

Stimulace: nitrát
sacharidy
cytokininy
světlo

Inhibice: produkty asimilace dusíku (NO_2^- , NH_4^+ , AK)
nedostatek nitrátu
tma

2. posttranslační modifikace (minuty) – regulace aktivity NR v buňce již přítomné, regulace koncentrace NR v buňce

Stimulace: světlo
 $\uparrow \text{CO}_2$
 anoxie

Inhibice: tma
 $\downarrow \text{CO}_2$
 kyslík

Buchanan 2000

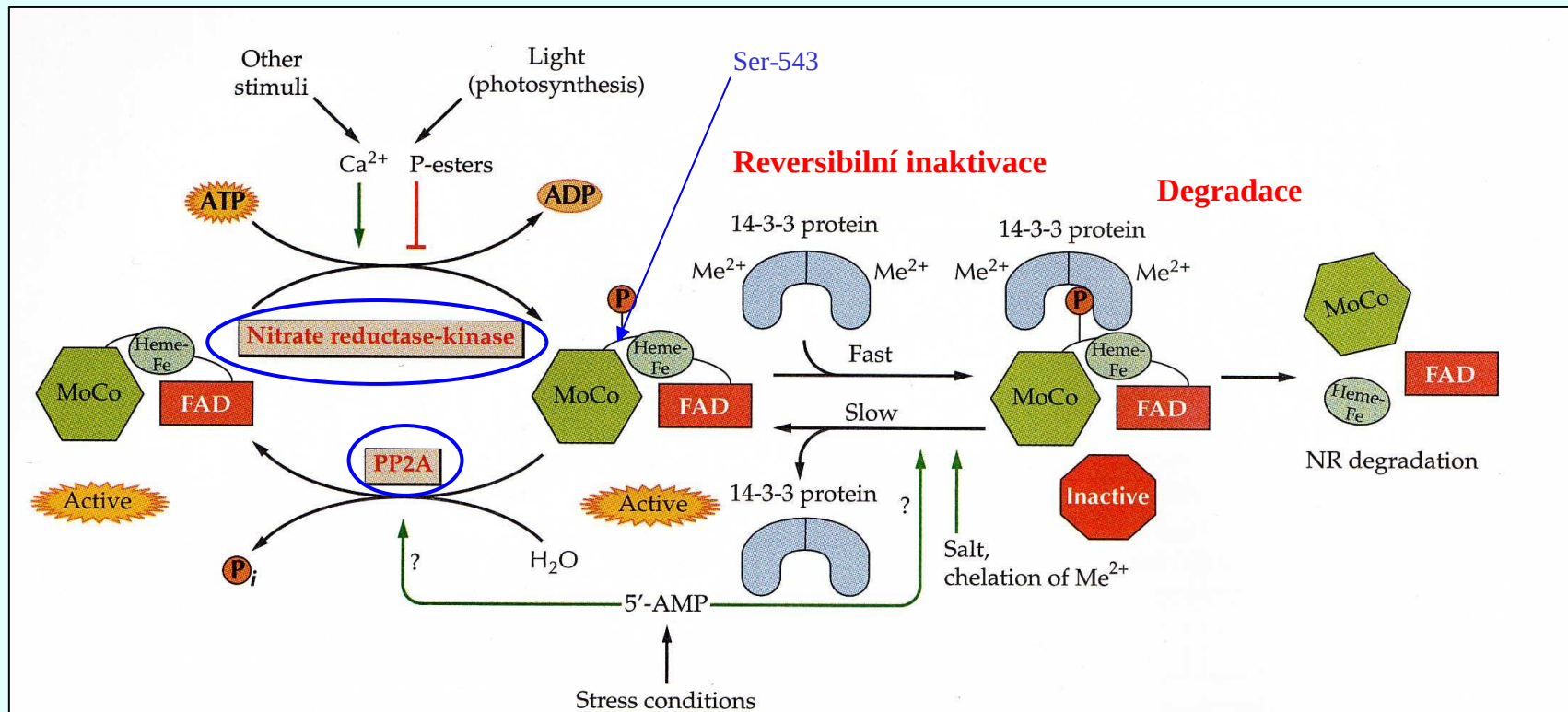
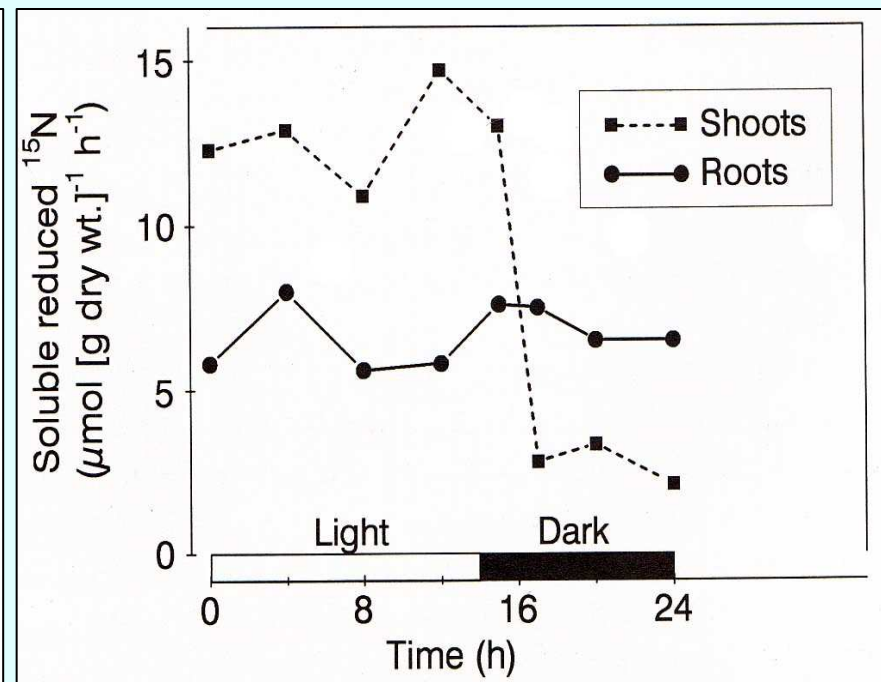
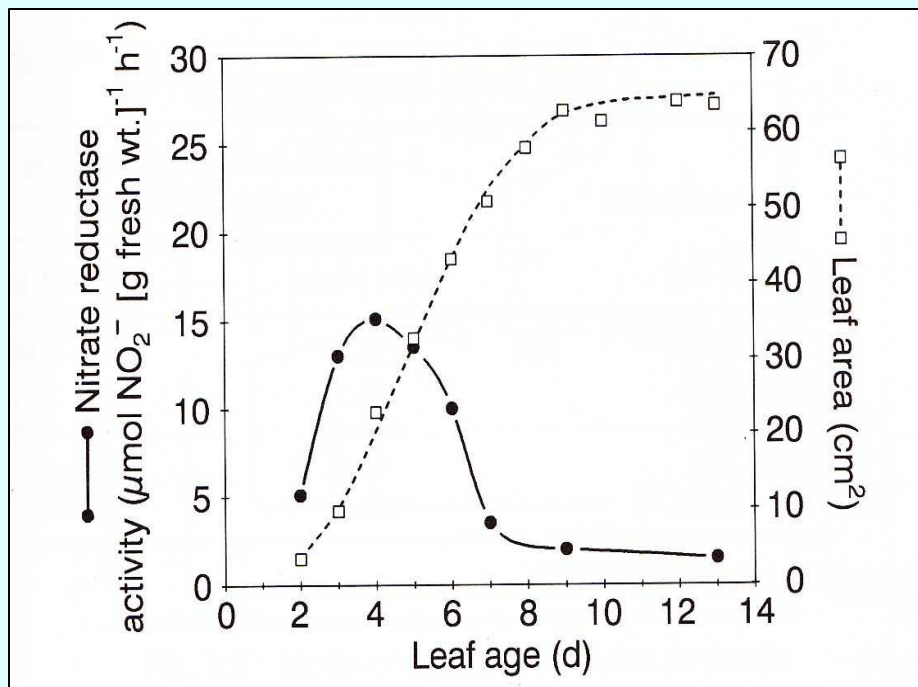


Figure 16.42

Proposed model for regulation of nitrate reductase activity by phosphorylation/dephosphorylation and reversible binding of 14-3-3 protein. NR is phosphorylated by protein kinases on a serine residue in hinge 1. Phosphorylated NR is still active but is bound by

14-3-3 dimers, which inactivate NR. NR in 14-3-3 complexes is more rapidly degraded than free NR and is not an available substrate for phosphatases. If NR is released from 14-3-3 proteins, the regulatory phosphate can be removed by protein phosphatase PP2A.



Marschner 1995

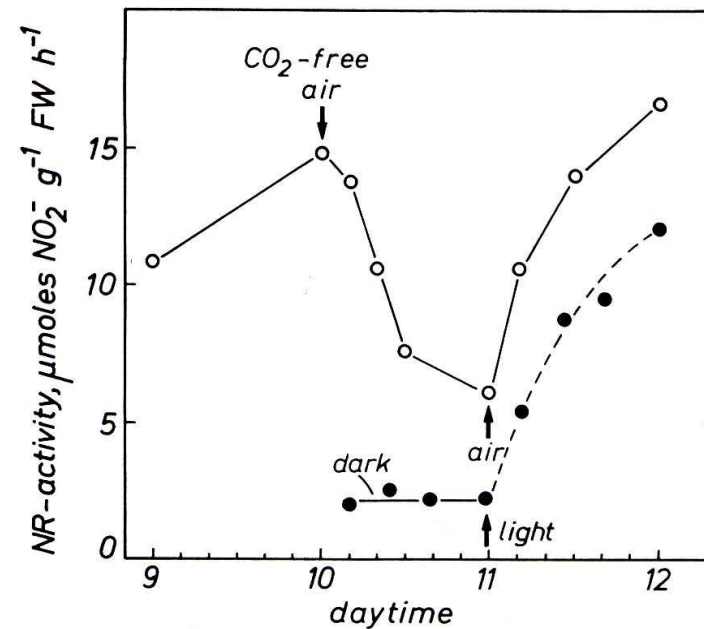


Figure 6. Extractable nitrate reductase activity in illuminated spinach leaves in response to changing CO₂ supply, or during a dark-light transition in air (dashed line). Leaves were flushed with air or CO₂-free air in a glass cuvette mounted in a temperature controlled growth chamber (22°C, 400 μE m⁻² s⁻¹ PAR). At the times indicated, two leaves were taken out of the cuvette and were immediately plunged into liquid nitrogen. Extraction of nitrate reductase was done as described in "Materials and Methods." Each point represents the mean of two separate experiments with two different leaves per sample.

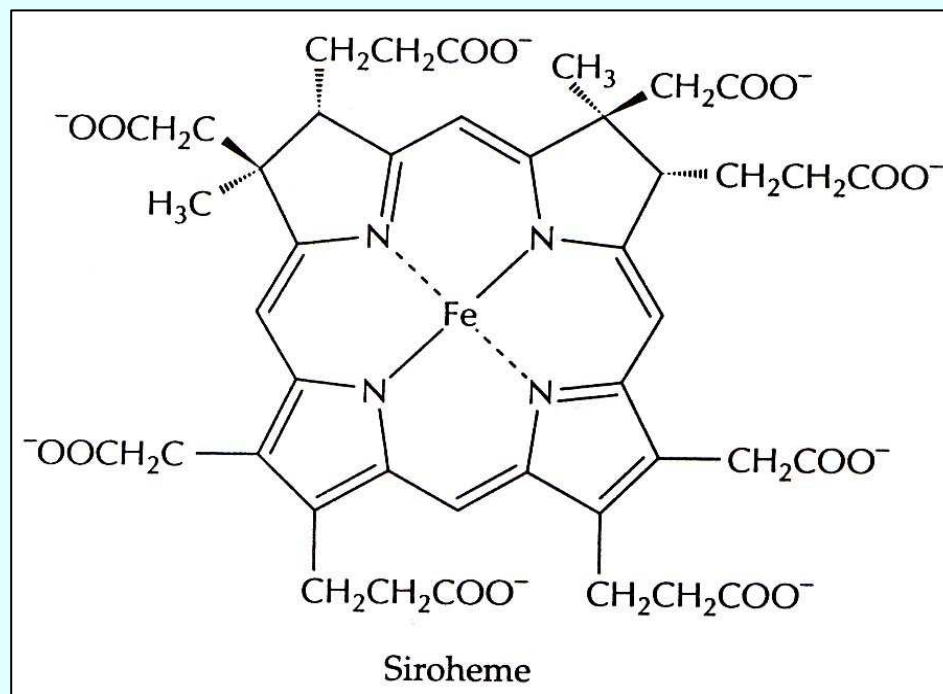
Redukce nitritu na amonný iont:



- probíhá v chloroplastech listů nebo proplastidech kořenů
- reakce katalyzována **nitritreduktázou (NiR)**

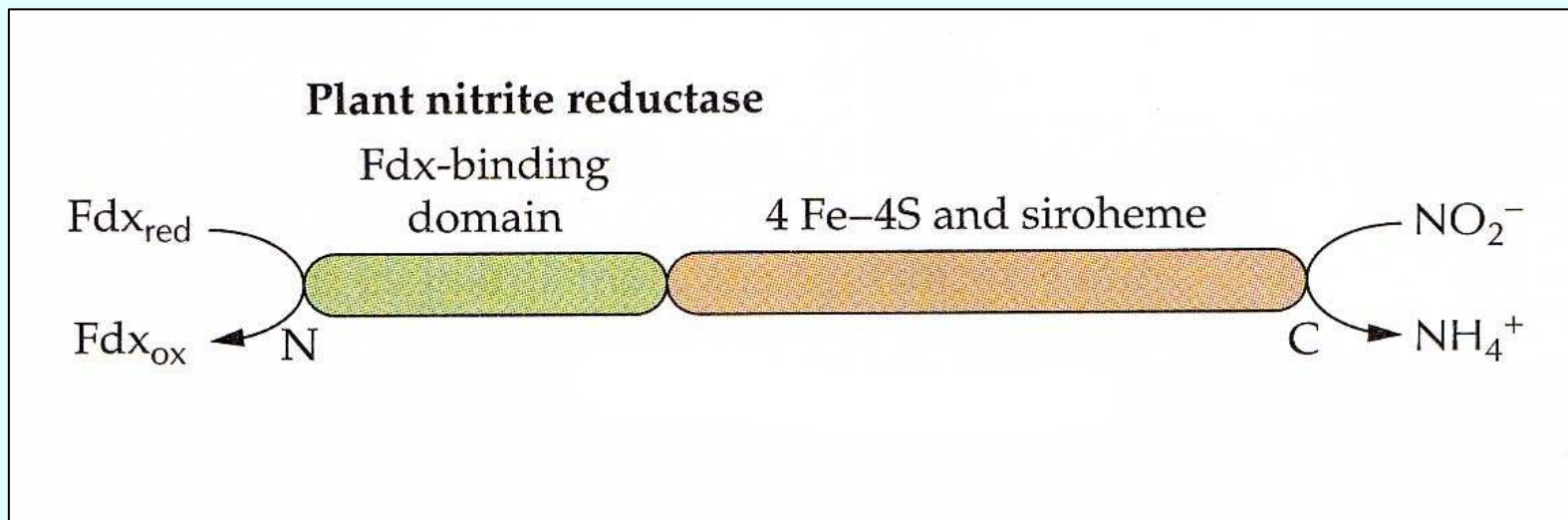
Nitritreduktáza (NR, EC 1.7.7.1)

- monomerní polypeptid (60-63 kDa) se sirohemovou prosthetickou skupinou a 4Fe-4S centrem



Buchanan 2000

- tvořen 2 funkčními doménami



Buchanan 2000