

Precipitazioni atmosferiche:

$$N_2 + O_2 \longrightarrow 2 NO + O_2 \longrightarrow$$

 $N_2 + O_2$ 2 NO + O_2 2 NO₂ ossido di N, (scariche elettriche, alte temp)

reagisce spontaneamente con H₂O

$$3 \text{ NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{ HNO}_3 + \text{NO}$$
 ac. Nitrico

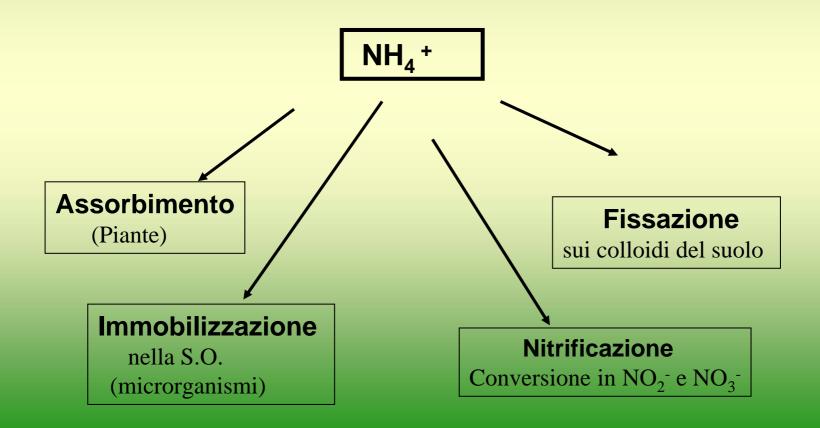
10- 20 Kg/ ha / anno proviene da tali fonti

NH₃ è un gas a temp ambiente

$$NH_3 + H_2O \longrightarrow NH_4^+ + OH^-$$

A pH ~ 7 la (NH_3) è trascurabile

- sono 2 forme molto solubili
- entrambe direttamente assorbibili dalle piante



Effect of pH and Nitrogen Source in the Nutrient Solution on the Assimilation and Transpiration
Rate of Cucumber Plants^a

рН	Nitrogen source (mm)			Assimilation	Transpiration
	Nitrate N	Ammonium N	$Ammonia^b$	rate (mg CO ₂ dm ⁻² h ⁻¹)	rate (g H ₂ O dm ⁻² h ⁻¹)
6.50	3	0	0	0 6.15	
7.75	3	0	0	6.55	2.18
6.50	3	5	0.01	6.60	1.80
7.75	3	5	0.16	4.48	1.39

[&]quot;Based on Schenk and Wehrmann (1979).

A pH > 7 — Aumento rapido della NH_3

A pH neutro-acido molte specie tollerano elevate concentrazioni di NH₄⁺

$$NH_3 + H+$$
 \longrightarrow NH_4^+

Tossicità dell'ammoniaca:

Facilità di attraversamento della membrana Nei cloroplasti azione ossidativa a livello dei tilacoidi

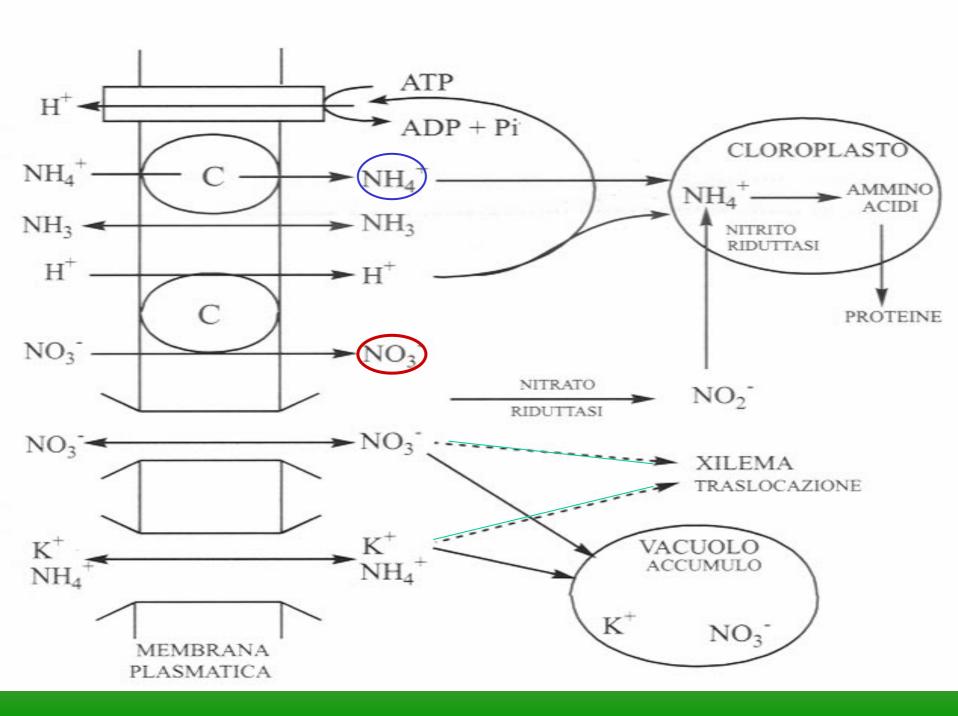
Inibizione della germinazione Inibizione della respirazione Danneggiamento delle radici

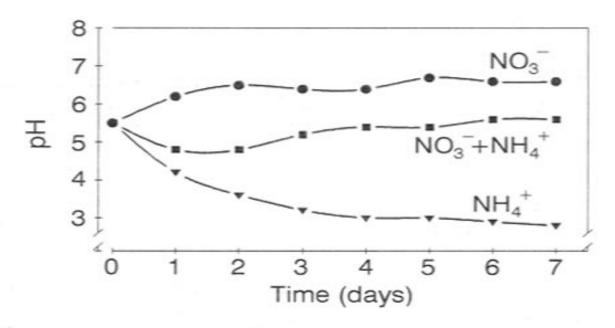
^bCalculated NH₃ concentration in the aqueous solution.

ASSORBIMENTO NELLE PIANTE DELLE FORME AZOTATE

- Per il **NITRATO**, **NO**₃-, 2 sistemi:
- 1. Sistema ad alta affinità, dovuto a un carrier inducibile
 efficiente a basse concentrazioni (< 1 mM), con flusso basso
 Attività dell'ATPasi Gradiente protonico

 Cotrasporto 2H+ / NO₃-
- 2. Sistema a bassa affinità, di tipo costitutivo (canale anionico?) attivo a concentrazioni elevate (> 1mM) ma con flusso maggiore.
- Per lo ione AMMONIO, NH₄⁺
 È assorbito in relazione all'efflusso di H+
 Tramite un Carrier definito ad alta affinità
 - Assorbimento dell' AMMONIACA, NH₃:
 Diffusione attraverso lo strato lipidico
 Favorita da elevati pH all'esterno della radice





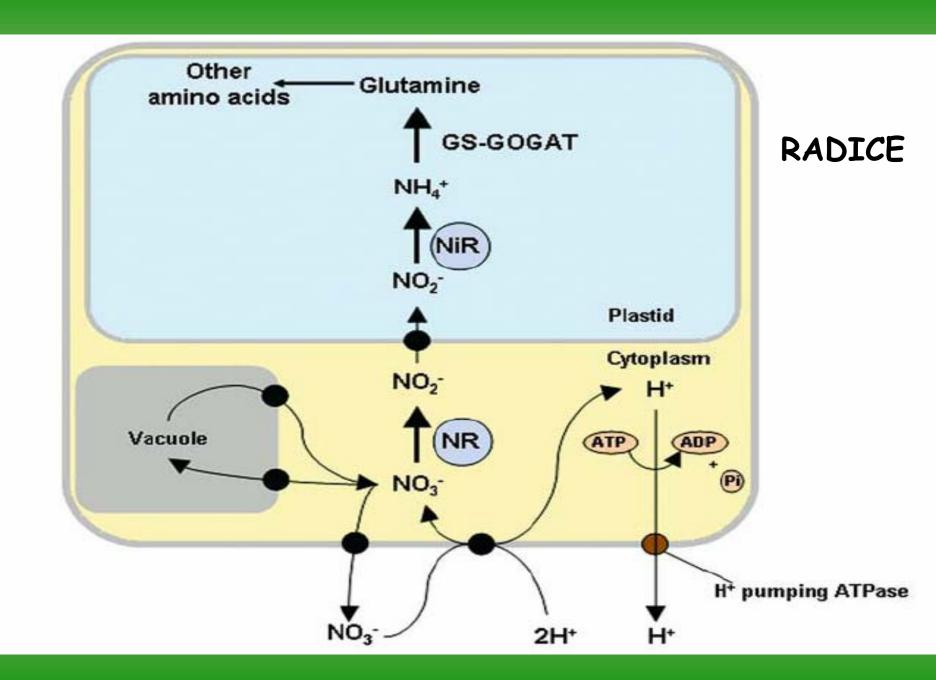
La fonte di N influisce sul pH della soluzione esterna:

• L' NH_4^+ diminuzione pH soluzione esterna

• $NH_4^+ + NO_3^-$ iniziale diminuzione di pH (assorbimento di NH_4^+) aumento di pH (assorbimento di NO_3^-)

migliore per la pianta:

- la produzione di H⁺ ~ produzione di OH ⁻
 rappresenta la situazione
 La regolazione del pH non richiede elevat
 - La regolazione del pH non richiede elevati costi energetici



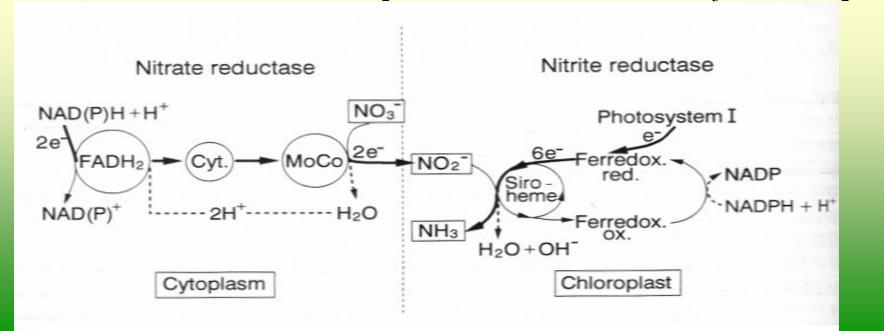
ASSIMILAZIONE ------- RIDUZIONE DEL NITRATO

$$NO_3^- + 8 H^+ + 8 e^- \longrightarrow NH_3 + 2 H_2O + OH^-$$

- 2 Enzimi lavorano in serie:
- La Nitrato reduttasi NR

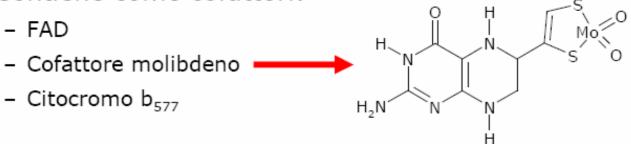
$$NO_3^- + NADH + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NO_2^- + NAD(P) + H_2O$$

- Nitrito reduttasi NiR $NO_2^- + 6 e^- + 6 H^+ \longrightarrow NH_3 + OH^- + H_2O$



Nitrato reduttasi

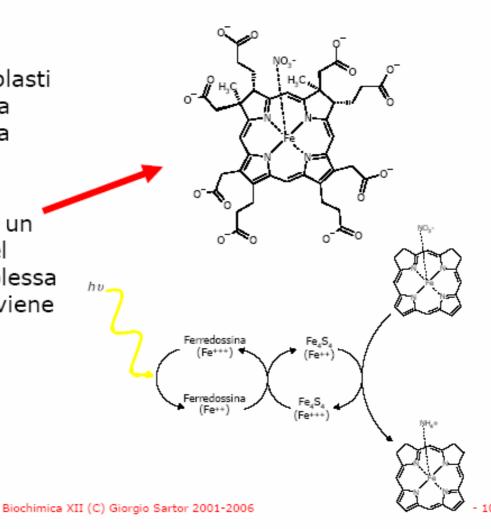
- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- Contiene come cofattori:



• La catena di trasferimento elettronico:

Nitrito reduttasi EC 1.7.1.4

- La nitrito reduttasi presente nei cloroplasti agisce attraverso la ferredossina ridotta dalla fotosintesi,
- Il trasferimento di elettroni coinvolge un gruppo siroeme nel quale il ferro complessa lo ione nitrito che viene ridotto a ione ammonio.



La Nitrato reduttasi

• È un E. substrato-inducibile (regolazione trascrizionale):

La <u>presenza di NO₃</u>-nel citosol aumento della sintesi dell'E.

Incremento di attività dell'E.

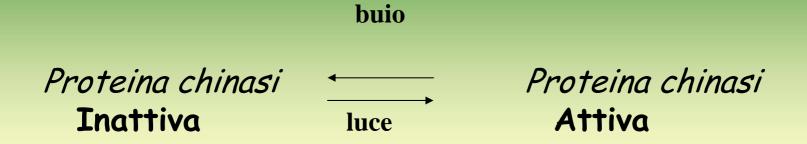
La presenza di prodotti di assimilazione azotati (a.a., amidi..)

Inibizione dell'attività dell'E (feed-back negativo)

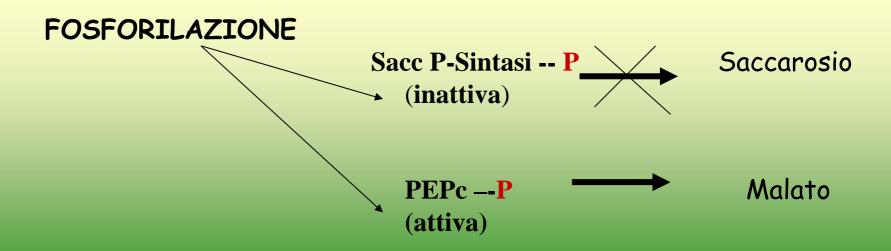
- Ha un veloce turn-over : continua sintesi e degradazione
- La sua attività è modulata da alcuni effettori:
- 1. Nitrato agiscono da segnali che influenzano
- 2. Luce la ripartizione del C fotosintetico nelle foglie fra sintesi di saccarosio e Sintesi di a.a.

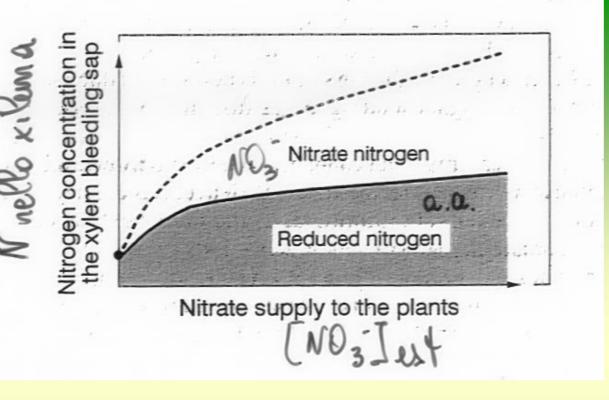
 due vie competono per gli scheletri C

Il flusso di C è regolato da una proteina chinasi citosolica



opera una fosforilazione e modula l'attività dei 2 E chiave:





La **riduzione** del nitrato avviene sia nelle *foglie che nelle radici,* dipende da:

- specie vegetale,
- età della pianta,
- concentrazione di NO₃⁻
 esterno

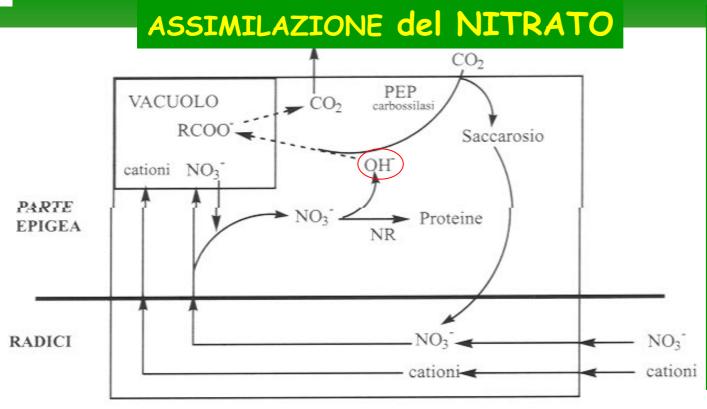
In generale:

• Quando il <u>rifornimento</u> esterno di nitrato è <u>basso</u>

Un'elevata quantità è organicato nelle radici Elevata concentrazione di a.a. nel succo xilematico

• <u>All'aumentare della concentrazione esterna</u> di nitrato:

Una proporzione crescente di NO₃⁻ viene traslocato alle foglie nello xilema



Avviene prevalentemente nelle foglie

La produzione di OHrichiede la sintesi *di*acidi organici che
dissociando con gli H+
tamponano il pH
intracellulare e vengono
accumulati nel vacuolo

Meccanismi di osmoregolazione:

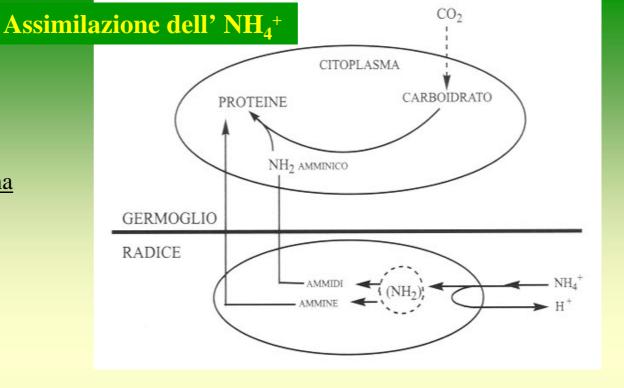
- Ritraslocazione nel floema verso aree in crescita dell'N ridotto (a.a, amidi) + cationi mobili (K e Mg)
- Ritraslocazione verso le radici di anioni di acidi organici (malato) + K^+ successiva decarbossilazione e rilascio di HCO_3^-
- Uptake di NO₃⁻: Il K+ agisce da contro-ione nel trasporto in salita del NO₃⁻ assorbito a livello radicale

Se il nitrato può essere accumulato nei vacuoli senza danno L'NH₄⁺ e soprattutto l'NH₃ sono tossici a basse concentrazioni: Nel citoplasma NH₄⁺ < 15 µM

NH₄⁺ < 15 μM

Nel vacuolo anche

conc + elevate in quanto il
basso pH previene la
formazione di NH₃



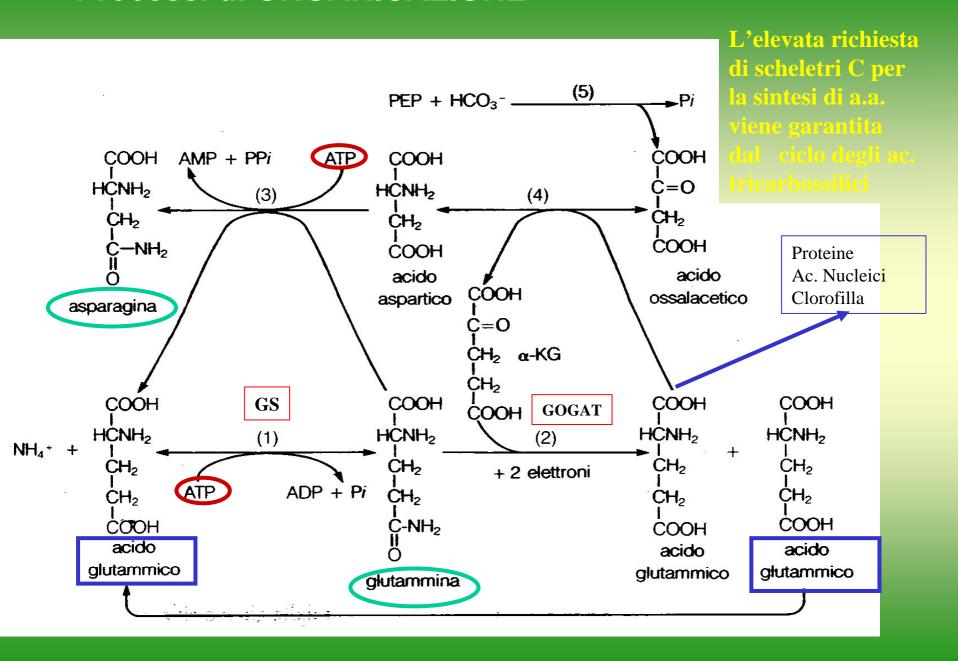
L'assorbimento di NH_4^+ nella radice comporta il rilascio di H^+ per la compensazione di cariche: antiporto NH_4^+ / H^+

• Quasi tutto l'NH₄+ è assimilato nelle radici: 3 NH₄+ \rightarrow 3 NH₂-R + **4 H**⁺

* Produzione di H* Acidificazione del citoplasma

Acidificazione del citoplasma e aumento dell'invio di H⁺ all'esterno

Processi di ORGANICAZIONE



La conversione dell'ammonio in azoto organico è il risultato della Attività di 2 Enzimi:

- 1. GS = glutammina sintetasi
- 2. GOGAT = glutammato sintetasi

L'asparagina è la 2^a ammide importante per le piante in particolare nelle leguminose originarie dei climi temperati

È ottenuta mediante idrolisi dell'ATP

L'N dell'aspartato può derivare dal glutammato

I 4 C derivano dall'ossalacetato

L'asparagina ha le stesse funzioni della glutammina

Frazioni azotate nelle piante Il turnover dell'N ha 3 tappe principali:



L'azoto che viene organicato nella pianta resta come tale

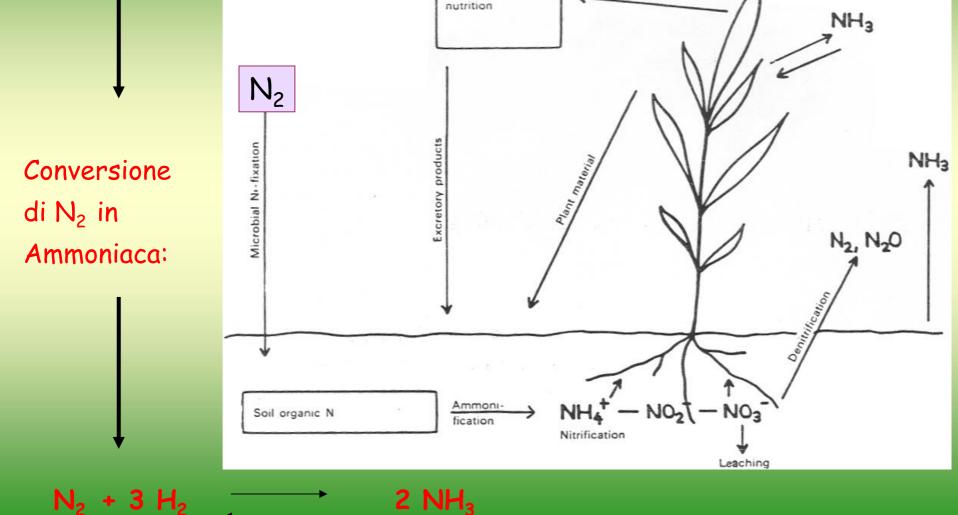
È un processo irreversibile

Le 3 frazioni azotate sono influenzate dalla nutrizione:

Aumentando il livello di nutrizione azotata

Incremento di tutte la frazioni
ma con intensità differente

Fissazione dell'azoto atmosferico



Human and animal Processo industriale (Haber - Bosch)
- impiego di catalizzatori
- alta Pressione (200 atm)
- elevate Temperature (400- 600 °C)

<u>Fissazione biologica</u> ad opera della <u>Nitrogenasi</u>

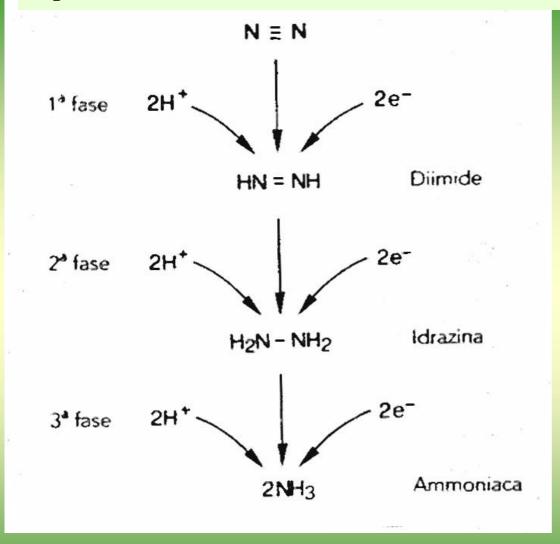
- Richiede dispendio di energia cellulare (ATP)
- Procede a p e Tambiente.

La **fissazione chimica** ha una capacità di fissazione pari a

1/4 della fissazione biologica

Il processo di N- fissazione è la risultante di

3 stadi di riduzione :



$$\Delta G_1^{\circ} = + 107 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta G_2^{\circ} = -27 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta G_3^{\circ} = -96 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta Gtot = -16 \text{ KJ/mole}$$

E' un processo esoergonico

richiede una notevole **energia di attivazione** perché l'N₂ è inerte

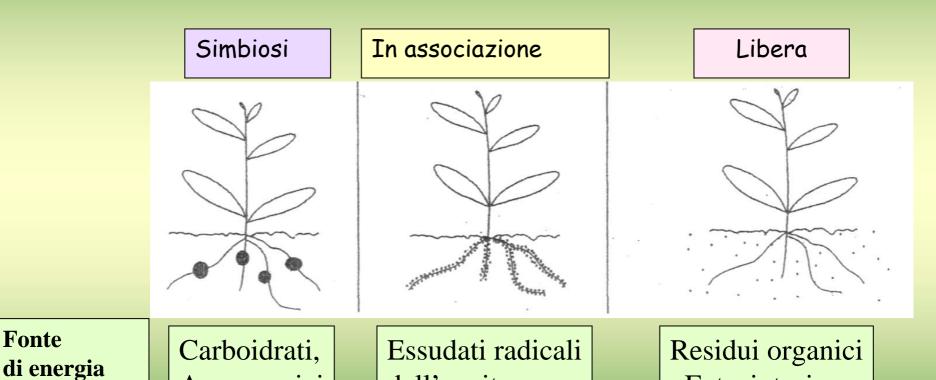
N fissazione biologica

3 strategie differenti

fonte energetica utilizzata

per

diversa capacità di fissazione



Kg N fissato/ ettaro/anno

Fonte

50-400

Ac. organici

10 - 200

dall'ospite

1-50

Fotosintesi

Fissazione di tipo associativo

I batteri diazotrofi in associazione sono eterotrofi

- Azospirillum e Azotobacter (zone tropicali)
- Enterobacter, Klebsiella (zone temperate)

Il **limite principale** consiste proprio nella scarsa disponibilità di **C org** in termini di **quantità** e **qualità**:

• Importanza della composizione del <u>substrato di C organico</u> fornito dall'ospite: preferenza per acidi carbossilici C4 e malato in particolare

La fissazione di tipo associativo è caratterizzata da

- Poca specificità pianta- ospite il partner è più casuale
- Trasferimento indiretto dell'N ridotto

 alla morte del

 batterio
- I batteri sono molto sensibili alla concentrazione di O_2 e di N nel suolo

Aumento dell'apporto di N nel suolo e diminuzione attività nitrogenasica in

Piantine di grano inoculate con Azospirillum

NH_4NO_3 supply $(g l^{-1})$	Nitrogenase activity (nmol C ₂ H ₄ per plant)	Shoot dry weight h^{-1} (g per plant)
0	200	0.49
0.04	. 156	0.97
0.08	10	1.84
0.16	0 +	2.93

From Cohen et al. (1980).

La quantità di N fissato per via associativa è molto variabile::

Plant species	Proportion of tota plant nitrogen
Rice (Oryza sativa L.)	0–35
Wheat (Triticum aestivum L.)	0-47
Sugar cane (Saccharum sp.)	2–56
	$(60-80)^b$
Forage grasses	
Brachiaria humidicola	30-40
Leptochloa fusca	2-41

Compiled data from Chalk (1991). Boddey et al. (1991).

La canna da zucchero ha la maggiore capacità di fissazione:

- alta qualità negli essudati radicali
- alte temperature del suolo
- associazioni a più alta specificità pianta-ospite
- maggiore resistenza alla presenza di N nel terreno

I batteri **diazotrofi associati** possono favorire la crescita della pianta ospite in 2 modi :

- 1) Apporto di N alla pianta mediante N-fissazione
- 2) Produzione di Fitormoni

Produzione di

Fitormoni

auxine, citochinine,

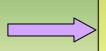
giberelline

•Modificazioni nella morfologia radicale e migliore acquisizione di nutrienti (fosforo)

 Influenza sull'attacco di altri organismi della rizosfera

 (patogeni , utili alla crescita)

 Prevalenza di N- Fissazione



Canna da zucchero, erbe foraggio C4 in condizioni favorevoli al processo:

- alta temperatura
- elevata irradiazione
- produzione di essudati radicali

Dominanza dell' Effetto Ormonale

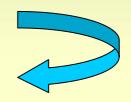


- Piante C3
- Piante in climi temperati
- Associazioni pianta-ospite poco specifiche

Batteri diazotrofi liberi

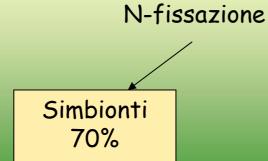
- cianofite) riduzione fotosintetica di N₂
- eterotrofi processo non (azospirillum) fotosintetico

inadeguata disponibilità di residui organici nel suolo



limitata attività di azoto- fissazione

Diverso contributo dei batteri diazotrofi nel processo di



Associati e Liberi 30%

Fissazione simbiotica dell'azoto

Le specie **Rhizobium** in simbiosi con le leguminose sono i più importanti azotofissatori

simbiosi altamente specifica:

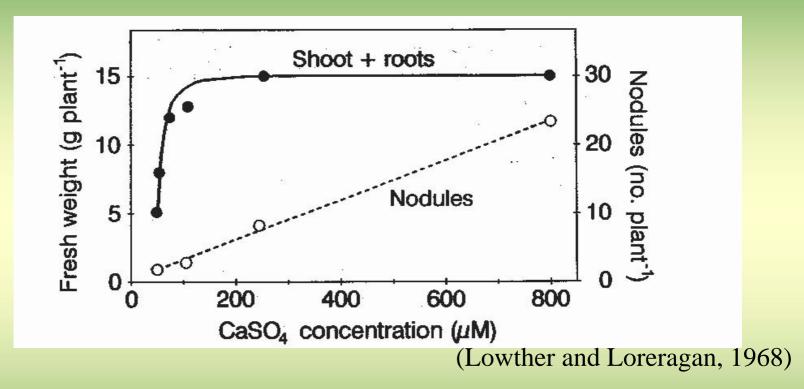
solo certi **ceppi** sono **compatibili** con una data leguminosa per formare **noduli funzionanti**

- Esempi di rapporto preferenziale tra specie di Rhizobium e piante ospiti.

Specie di Rhizobium	Piante ospiti		
R. leguminosarum	Pisello, Fava, Lenticchia, Cece		
R. trifolii	Trifoglio		
R. phaseoli	Fagiolo		
R. meliloti	Erba Medica, Fieno greco, Meliloto		
R. japonicum	Soia		
R. lupini	Lupino, Ginestrino		

Il processo di **nodulazione** (taglia e numero dei noduli) è favorito da:

1) Elevate concentrazioni di ioni Ca ²⁺



- favoriscono la produzione di peli radicali, siti di attacco
- stimolano la produzione di essudati radicali

- 2) valori di pH vicini alla neutralità
- 3) Adeguato **Rifornimento** di **P**: infezione con micorizze

aumento nodulazione

La formazione dei noduli è regolata da :

• Processo di autoregolazione o inibizione da feed-back

- Qualità e quantità della **fonte di N** fornita:
 - il nitrato amplifica il segnale regolativo alle basse concentrazioni
 - l'ammonio interferisce negativamente.

Fasi dell' Infezione da Rhizobium

I^a Tappa dell' infezione:

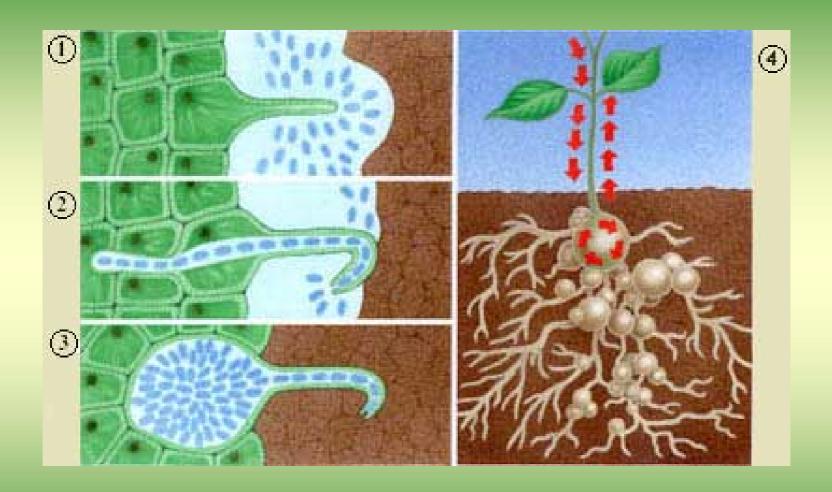
Interazione rizobio- pianta ospite

Colonizzazione La pianta rilascia essudati chemiotassi contenenti flavonoidi e isoflavonoidi nel batterio: - Attivazione geni nod - Produzione fattori nod Molecole segnale riconosciute + sostanze ormono-simili solo da specie compatibili (lectina) specificità Attacco dei batteri al pelo

II^a Tappa: incurvamento del pelo radicale (IAA) penetrazione filo di infezione III^a Tappa **Divisione cellule** corticali Rhizobium libero Parete cellulare Adesione Pelo radicale casuale corretta Adesione polare **Formazione** meristema del nodulo Batteri Batteri invasori **Batteroidi** Vacuolo Cellula infetta Sintesi di radicali - Nucleo Pelo libero Leg-Hb Batteroidi Membrana -Mitocondri Nitrogenasi Cellula infetta peribatteroide Pareti Cellula in fase cellulari

Rhizobium non differenziato

di divisione



Il processo di N-fissazione è attivo dopo 10-21 giorni dall'inizio dell'infezione fase di lag

3 condizioni essenziali per un processo efficiente:

Rifornimento adeguato di **fotosintati** ai batteroidi dei noduli

quantità di C impiegato è variabile

C = 6-12g per g di N fissato

Solve per l'attività di nitrogenasi per l'assimilazione dell'N ridotto

- 2) Mantenimento di basse concentrazioni di O₂ nei noduli
- 3) Rapida esportazione dell'N fissato: traslocazione nodulo-pianta

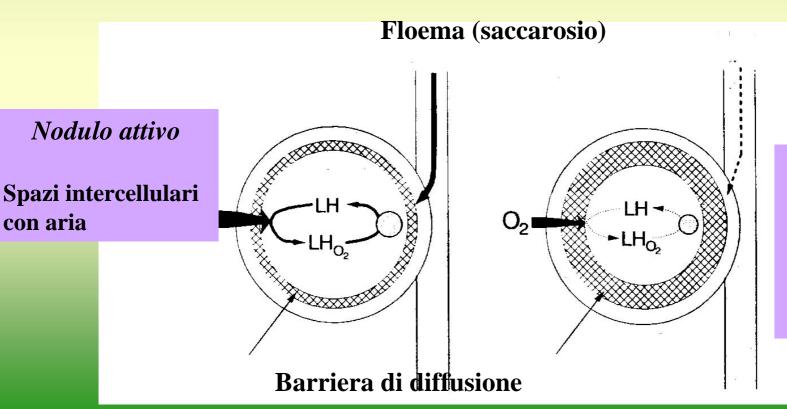
- Elevata domanda di energia (ATP)
- Protezione della nitrogenasi

con aria



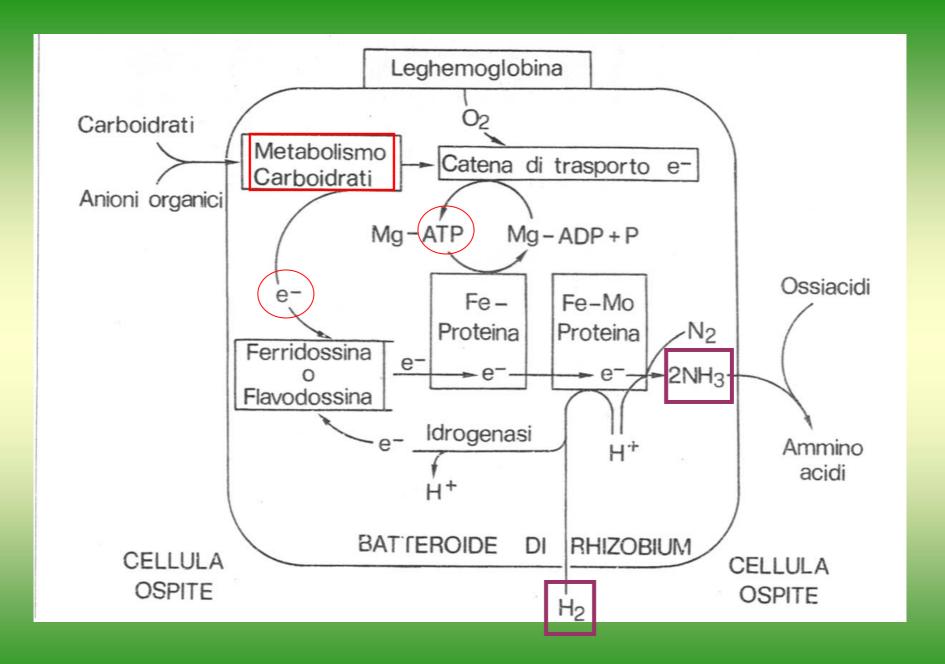
Sistema di regolazione della pO₂ a livello cellulare

- 1) Esistenza di una barriera fisica
- 2) Leg-emoglobina

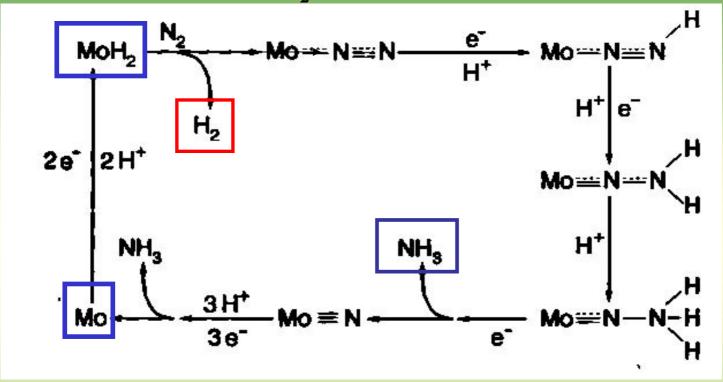


Nodulo non attivo

Spazi intercellulari con H₂O



La protonazione del Mo è una tappa richiesta affinchè $1'N_2$ si leghi alla proteina \longrightarrow rilascio di H_2



Stechiometria della reazione

$$N_2 + 8 H^+ + 16 ATP \longrightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$$

12 ATP per il sistema nitrogenasi + 4 ATP per formazione diH₂

- L' N fissato è rilasciato come NH₃ dal batteroide al citosol per semplice diffusione attraverso la membrana peribatteroide
- passaggio rapido:

 elevata NH₃ nel batteroide inibizione della nitrogenasi

• nel citosol:

L'azoto è il nutriente che maggiormente influisce sull'N-fissazione

Effetto del nitrato su

• Nodulazione N-starter, effetto stimolatorio Effetto inibitorio ad elevate concentrazioni

• Nitrogenasi — Inibizione dell'attività all'aumentare del rifornimento di N

Nitrate N	Nitrogenase activity (µmol C ₂ H ₄ produced per plant h ⁻¹)		N in shoots	Dry weight (g per plant) day 49	
fertilizer supply (kg ha ⁻¹)	35 days	49 days	(%) day 49	Shoot and roots	Nodules
0	1.13	† 0.19	† 1.54	2.53	0.18
25	2.26	0.33	1.82	3.35	0.28
50	0.60	0.10	1.67	3.65	0.13
100	0.14	0.03	1.69	4.35	0.11

[&]quot;Based on Sundstrom et al. (1982).

La crescita continua ad aumentare per assorbimento della fonte di N minerale