

AZOTO

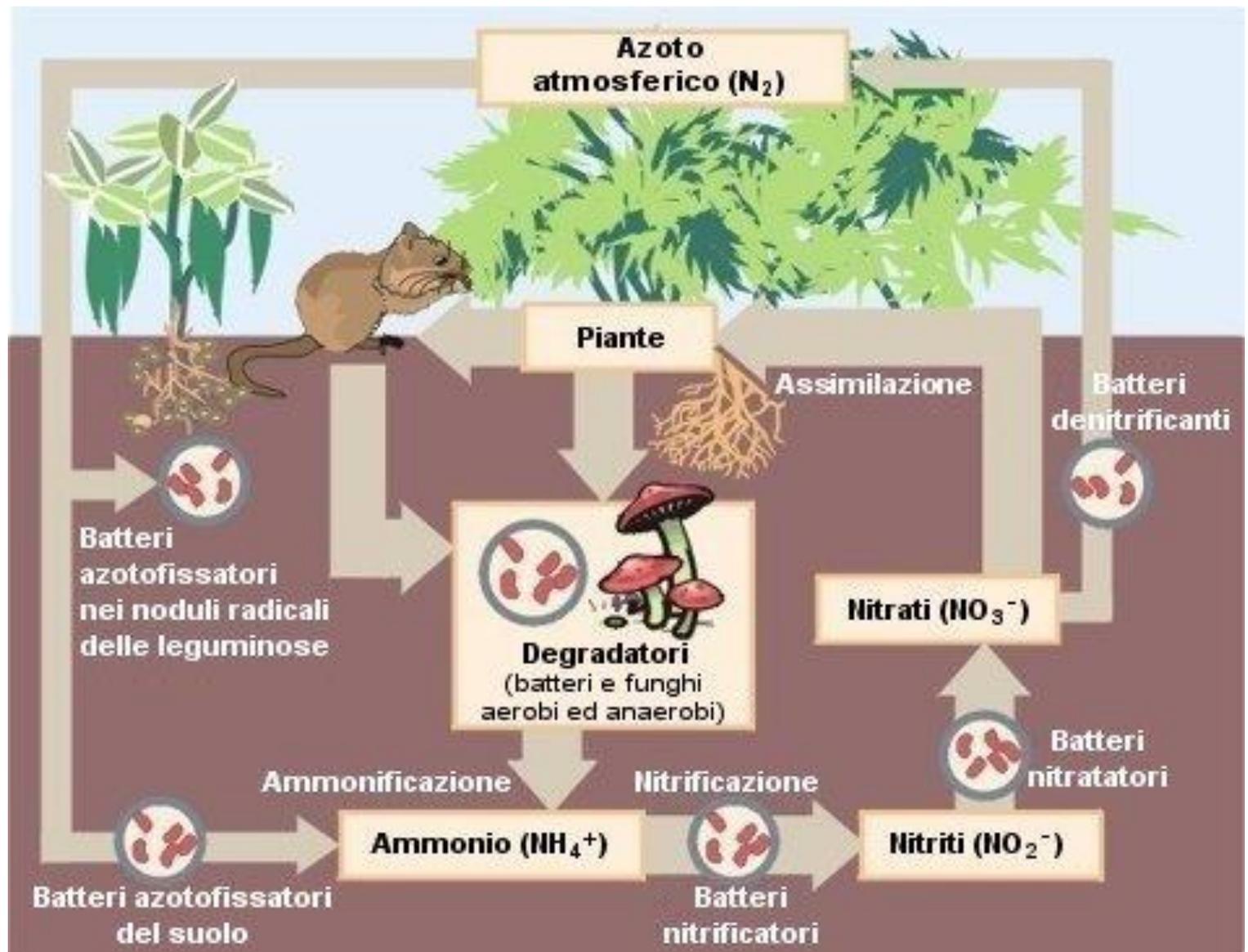
- L'azoto è ampiamente diffuso in natura
- È molto mobile
- Il contenuto maggiore è nella *litosfera* in combinazioni non ben definite.
- Una frazione ridotta nel suolo direttamente assorbibile dalle piante

{
Crosta terrestre
Rocce
Sedimenti

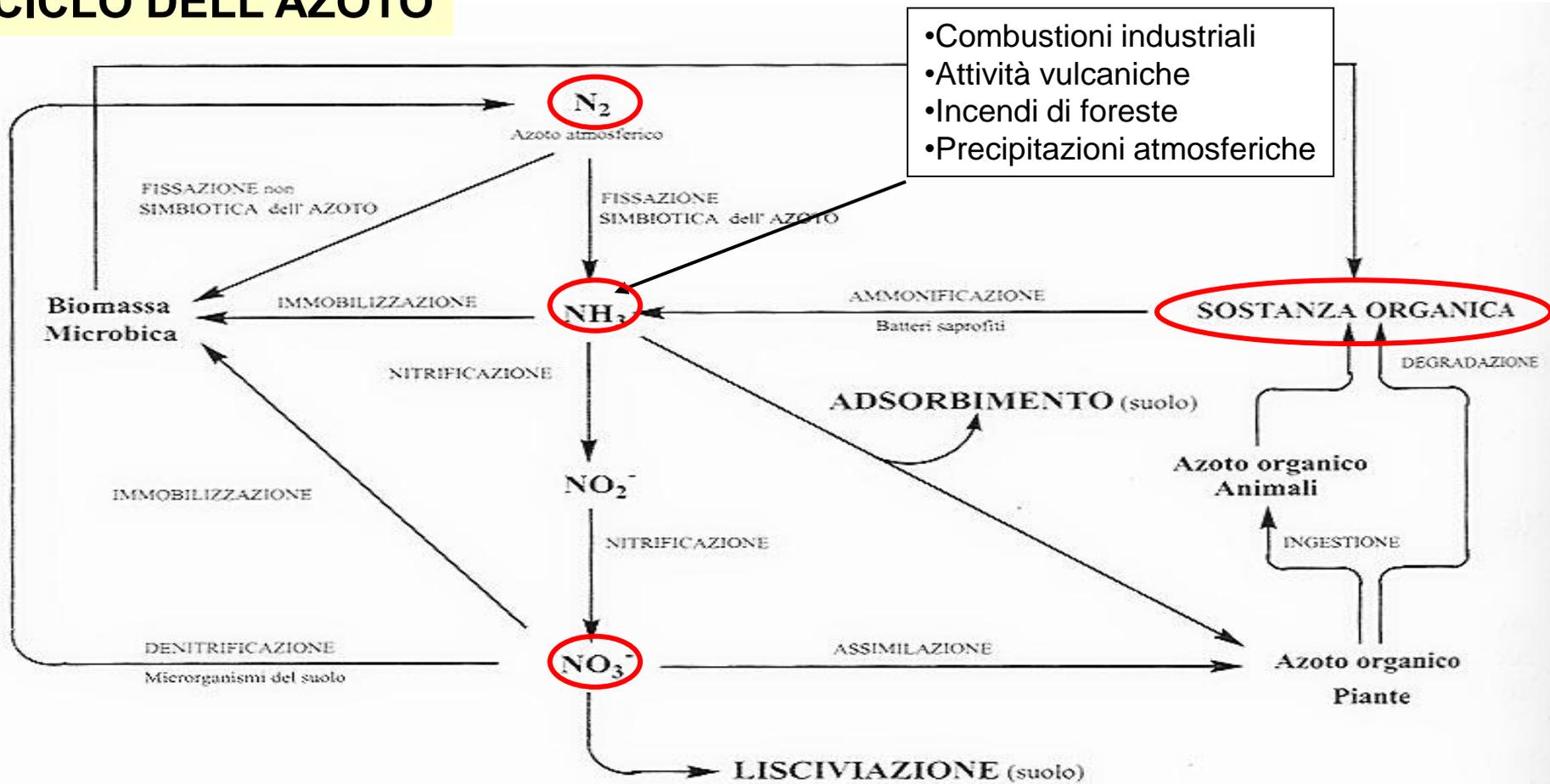
Tab. 18.1 - Quantità di azoto (tonnellate) presenti in natura.

	Quantità di azoto	% del totale
Litosfera	$57.4 \cdot 10^{15}$	93.8
Atmosfera	$3.8 \cdot 10^{15}$	6.2
Idrosfera	$2.3 \cdot 10^{14}$	0.04
Biosfera	$9.1 \cdot 10^{12}$	0.001

Il comparto *ambientale terrestre* si differenzia da quello acquatico per la *prevalenza delle forme organiche* su quelle inorganiche



CICLO DELL'AZOTO



Precipitazioni atmosferiche:

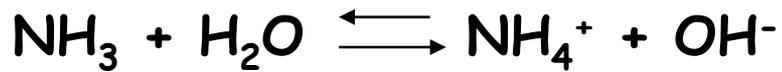


reagisce spontaneamente con H_2O



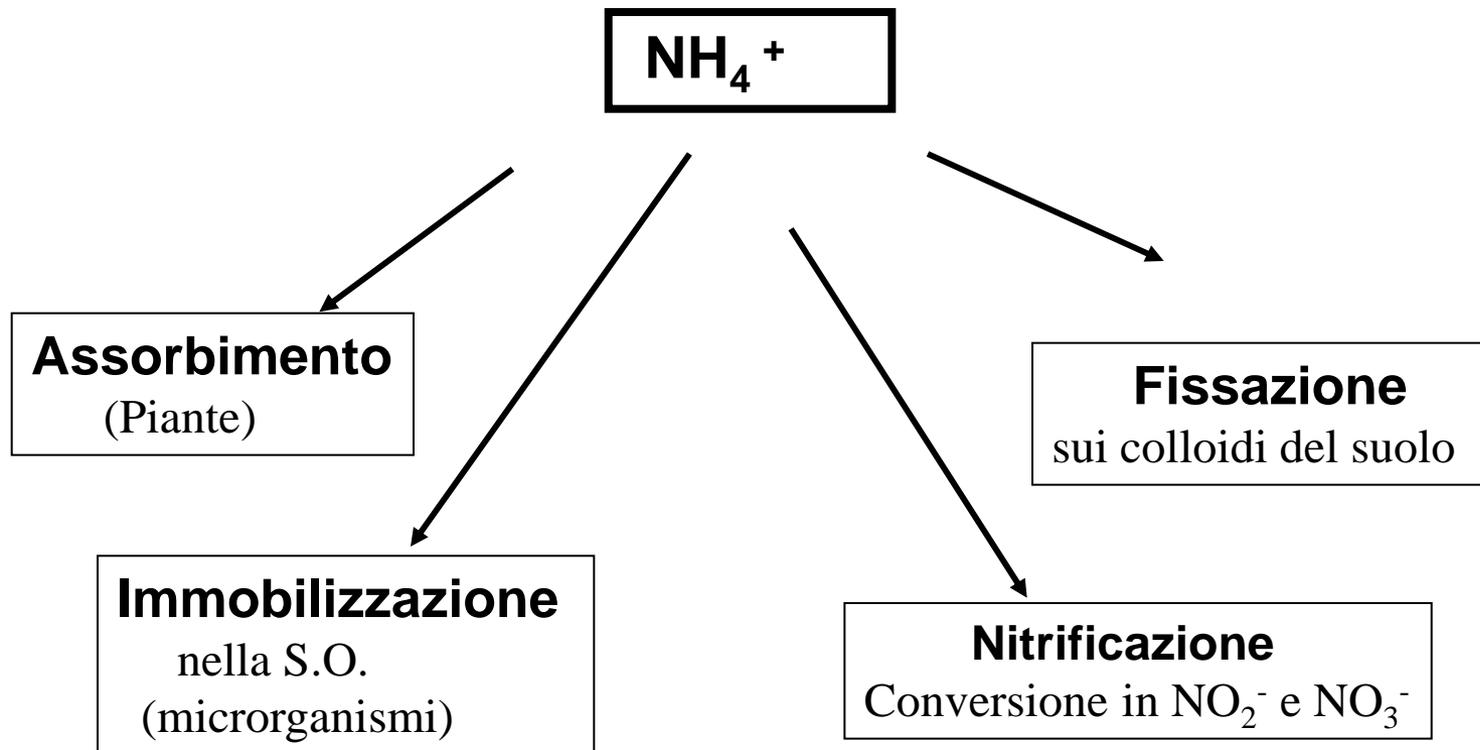
10- 20 Kg/ ha / anno proviene da tali fonti

NH₃ è un gas a temp ambiente



A pH ~ 7 la [NH₃] 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

pH	Nitrogen source (mM)		Ammonia ^b	Assimilation rate (mg CO ₂ dm ⁻² h ⁻¹)	Transpiration rate (g H ₂ O dm ⁻² h ⁻¹)
	Nitrate N	Ammonium N			
6.50	3	0	0	6.15	2.00
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

^aBased on Schenk and Wehrmann (1979).

^bCalculated NH₃ concentration in the aqueous solution.

A **pH > 7** → l' NH₄⁺ assorbito risulta fitotossico → Aumento rapido della NH₃

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



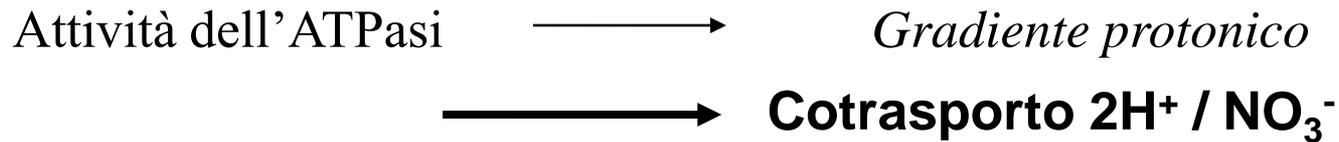
Tossicità dell' 'ammoniaca:

- Facilità di attraversamento della membrana
- Azione ossidativa nei cloroplasti a livello dei tilacoidi
- Inibizione della germinazione
- Inibizione della respirazione
- Danneggiamento delle radici

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 ($< 1 \text{ mM}$), con flusso basso



2. **Sistema a bassa affinità**, di **tipo costitutivo (canale anionico?)** attivo a concentrazioni elevate ($> 1 \text{ mM}$) ma con flusso maggiore.

- Per lo ione **AMMONIO, NH_4^+** :

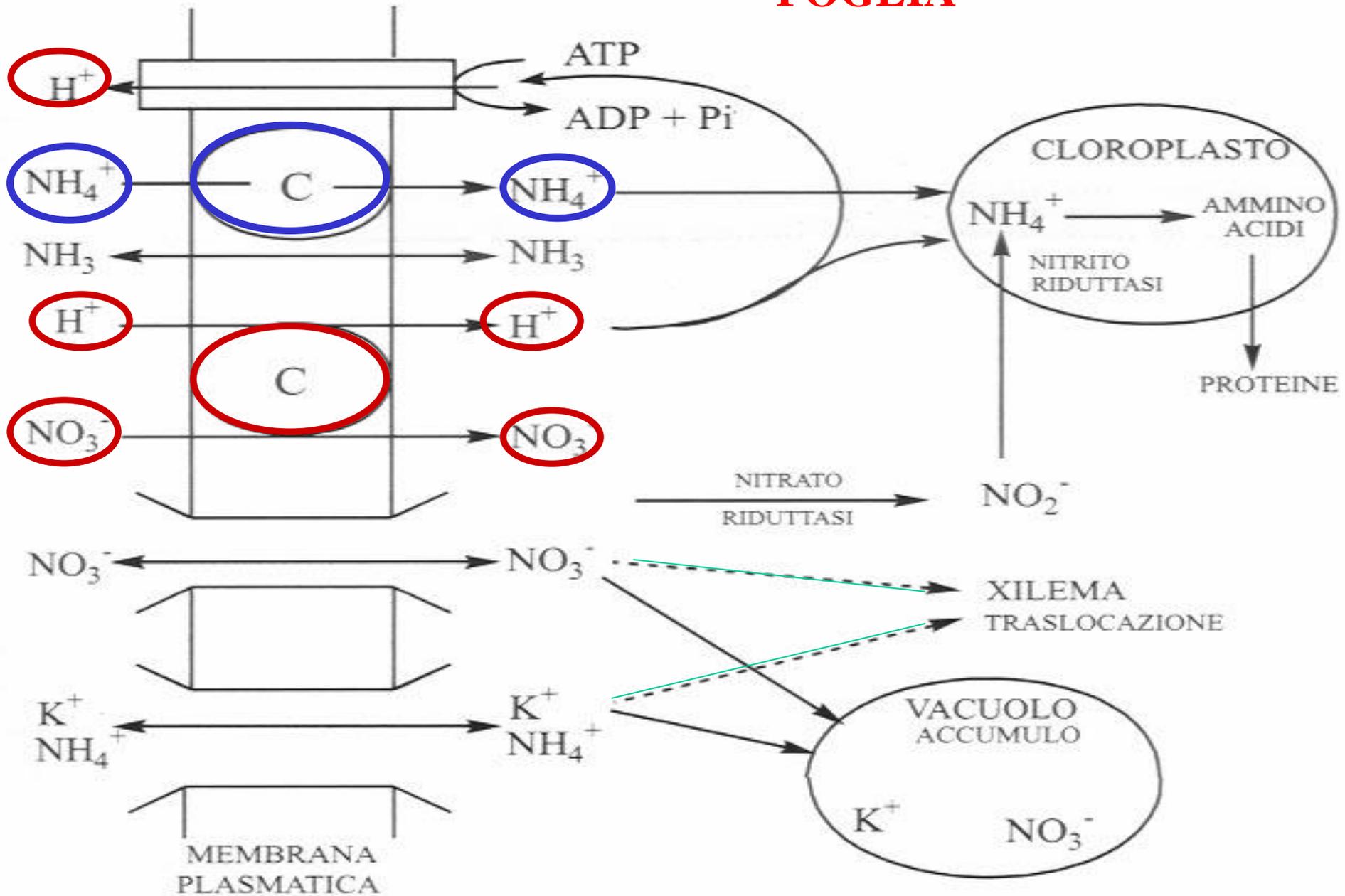
assorbimento in seguito **all'efflusso di H^+** , tramite un *carrier ad alta affinità*

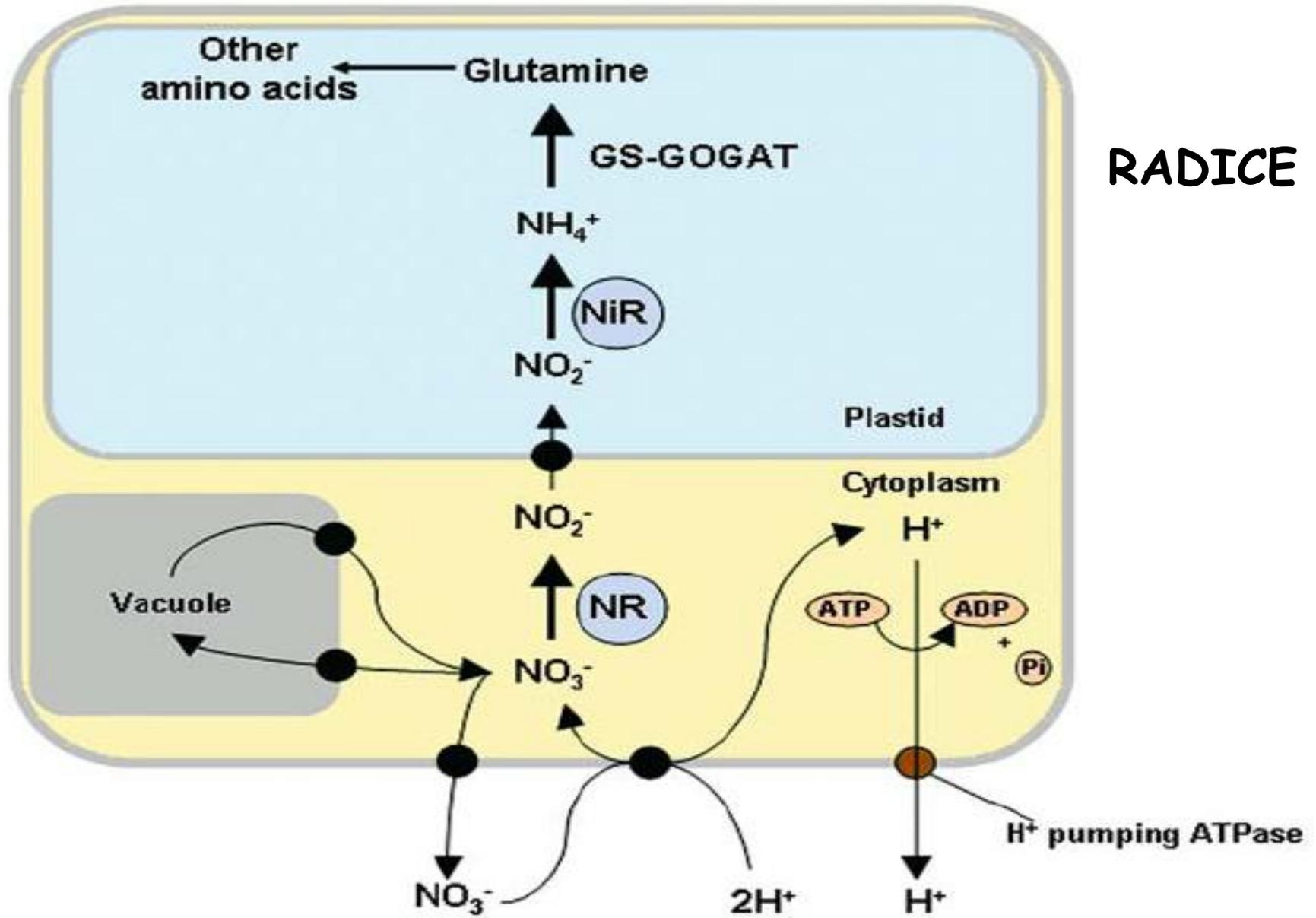
- Assorbimento dell' **AMMONIACA, NH_3** :

Diffusione attraverso lo strato lipidico

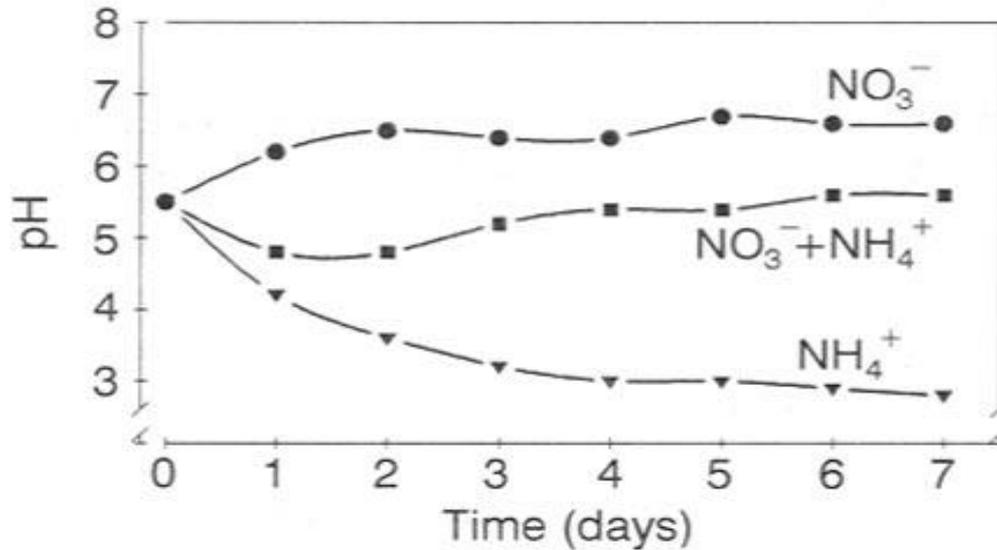
Favorita da elevati pH all'esterno della radice

FOGLIA





RADICE



La **fonte di N** influisce sul **pH della soluzione esterna:**

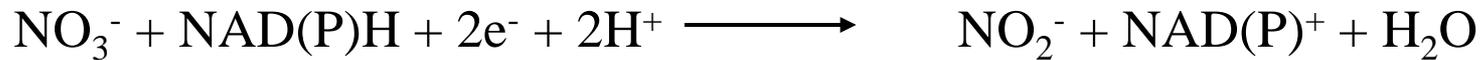
- L' NH_4^+ → *diminuzione pH soluzione esterna*
 - L' NO_3^- → *aumento pH soluzione esterna*
è assorbito di preferenza a pH inferiori della rizosfera
 - $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ *iniziale diminuzione di pH (assorbimento di NH_4^+)*
aumento di pH (assorbimento di NO_3^-)
- ↓
- rappresenta la situazione migliore per la pianta:* →
- la produzione di H^+ ~ produzione di OH^-
 - La regolazione del pH non richiede elevati costi energetici

ASSIMILAZIONE \longrightarrow RIDUZIONE DEL NITRATO

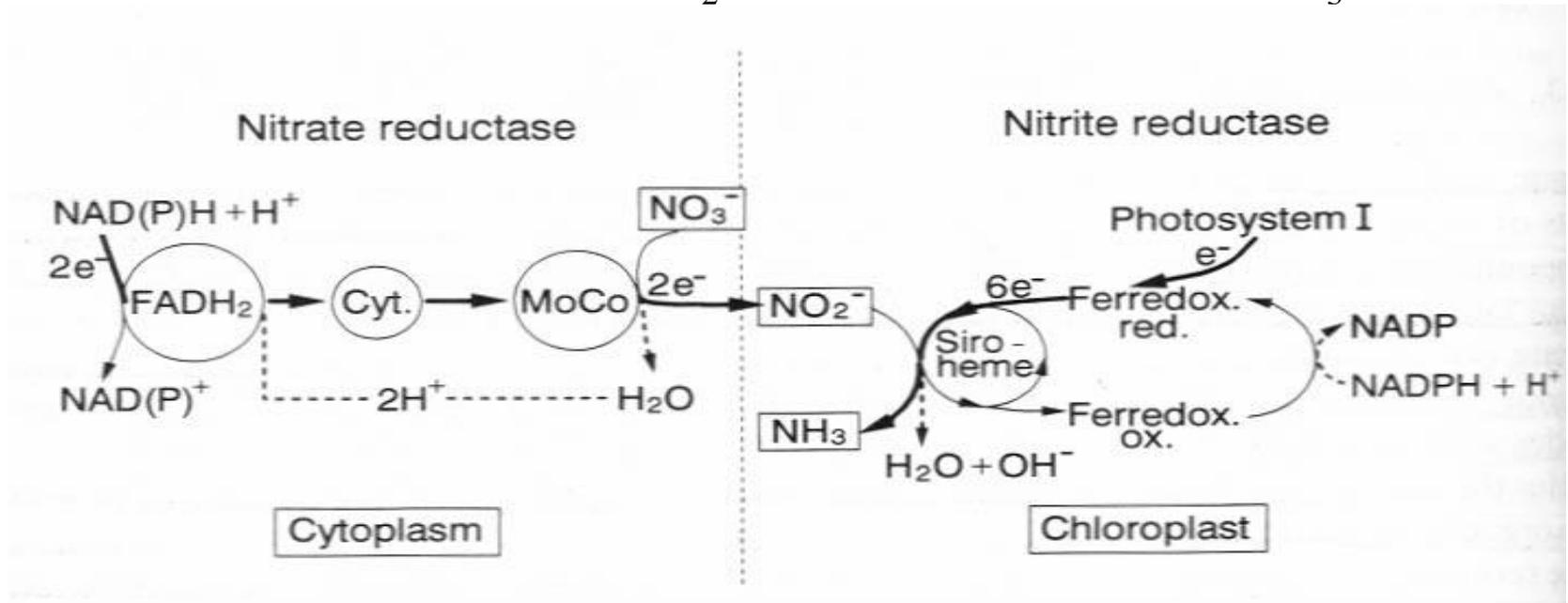


2 Enzimi lavorano in serie:

- La Nitrato reduttasi NR

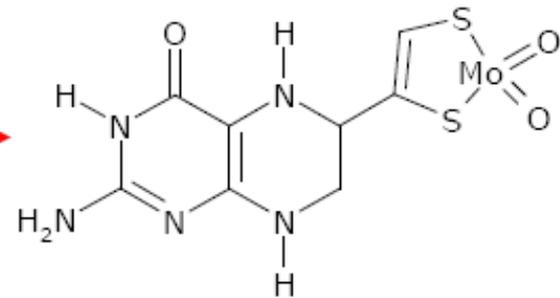


- Nitrito reduttasi NiR $\text{NO}_2^- + 6 \text{e}^- + 6 \text{H}^+ \longrightarrow \text{NH}_3 + \text{OH}^- + \text{H}_2\text{O}$

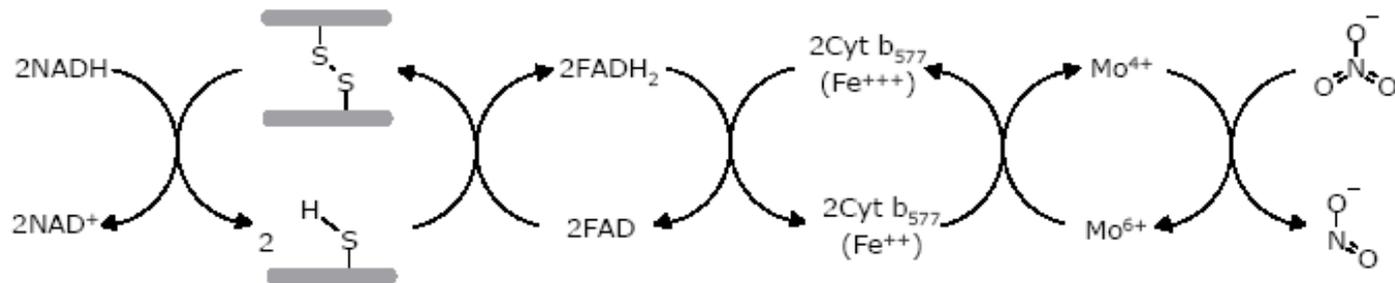


Nitrato reduttasi

- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- Contiene come cofattori:
 - FAD
 - Cofattore molibdeno
 - Citocromo b_{577}

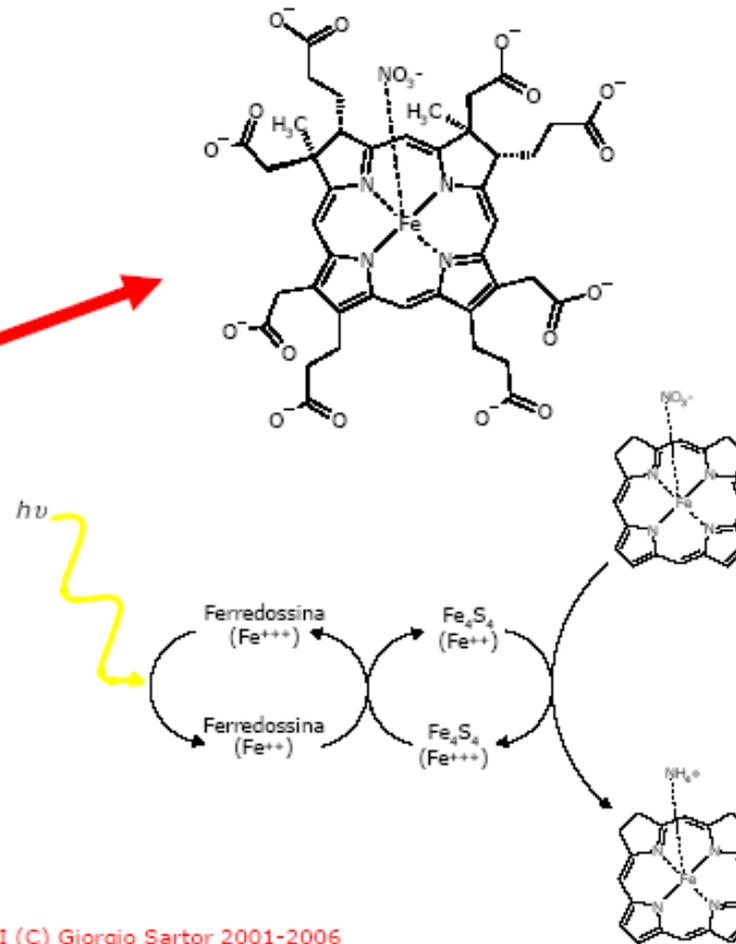


- La catena di trasferimento elettronico:



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):

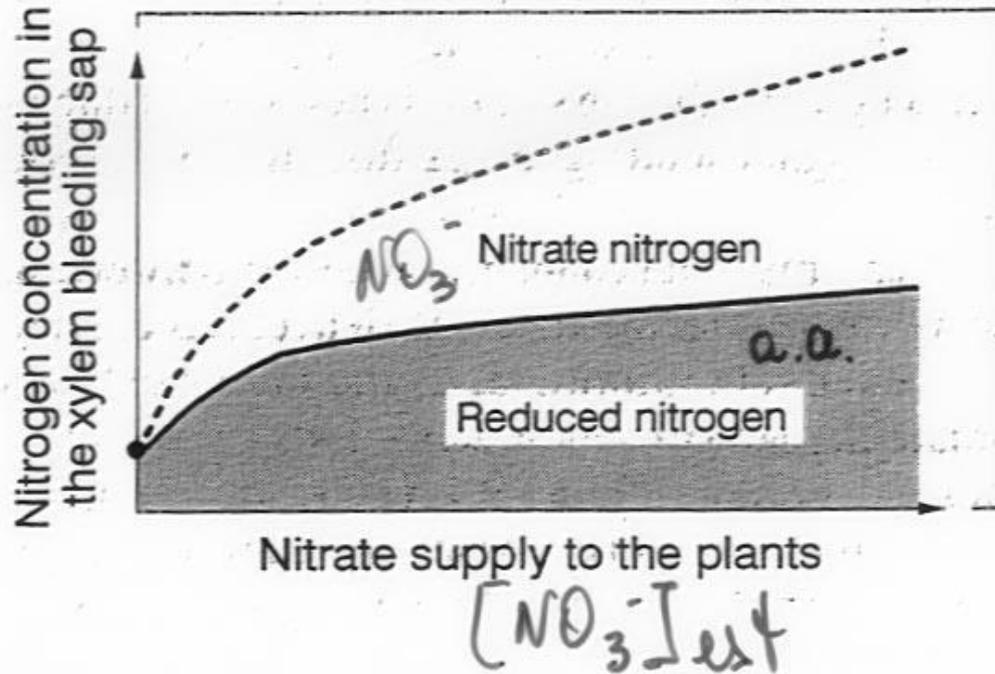
La presenza di NO_3^- nel citosol \longrightarrow aumento della sintesi dell'E.
 \longrightarrow Incremento di attività dell'E.

La presenza di prodotti di assimilazione azotati (a.a., amidi..) \longrightarrow Inibizione dell'attività dell'E: feed-back negativo

- Ha un veloce turnover : \longrightarrow 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

N nello xilema



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 rifornimento esterno di nitrato è basso



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

- All'aumentare della concentrazione esterna di nitrato:

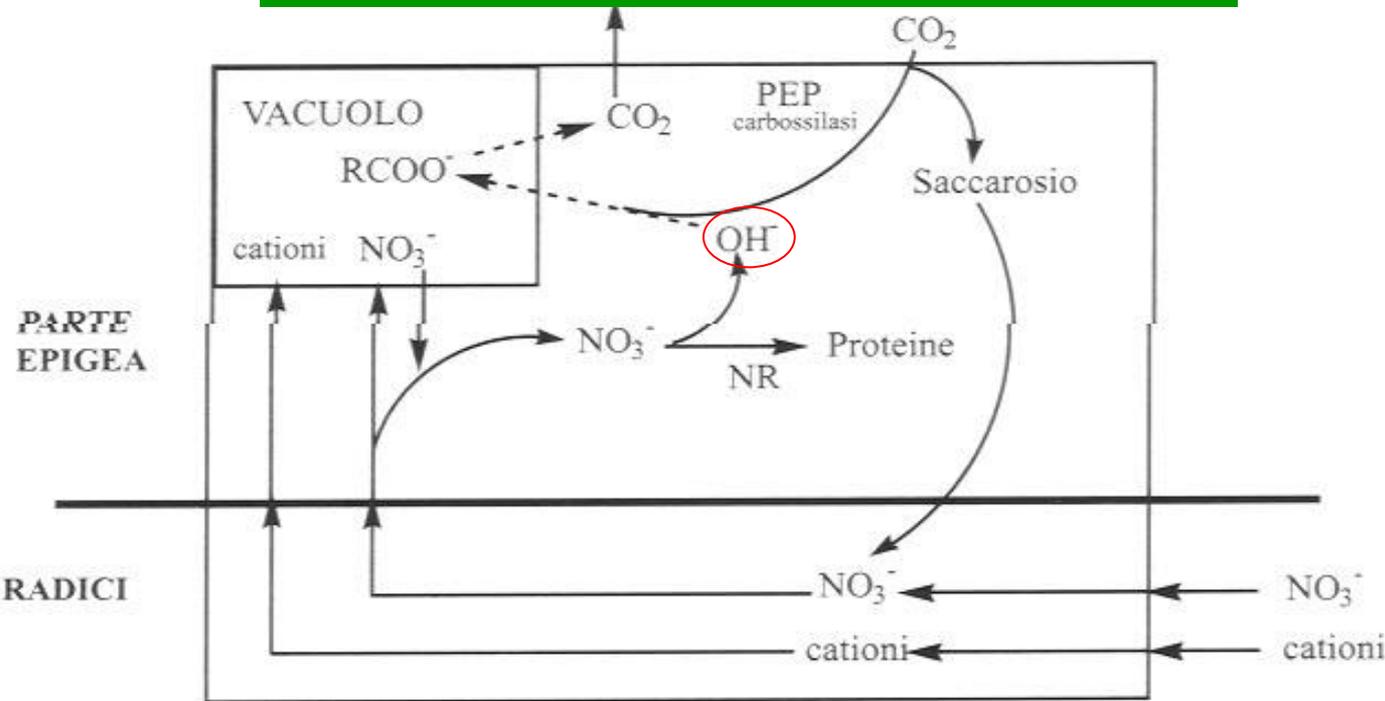


Una proporzione crescente di NO₃⁻ viene traslocato alle foglie nello xilema

ASSIMILAZIONE del NITRATO

Avviene prevalentemente nelle **foglie**

La produzione di OH⁻ richiede la sintesi *di acidi organici* che dissociando :
 produzione di H⁺ per tamponare il pH intracellulare e vengono accumulati nel vacuolo



Meccanismi di osmoregolazione:

- Ritraslocazione nel floema verso aree in crescita dell'N ridotto (*a.a, amidi*) segnali che regolano l'uptake del NO₃⁻
- Ritraslocazione verso le radici di anioni di **acidi organici (malato)** + **K⁺** successiva decarbossilazione e rilascio di HCO₃⁻
- Uptake di NO₃⁻ : **Il K⁺ agisce da contro-ione** nel trasporto in salita del NO₃⁻ assorbito a livello radicale

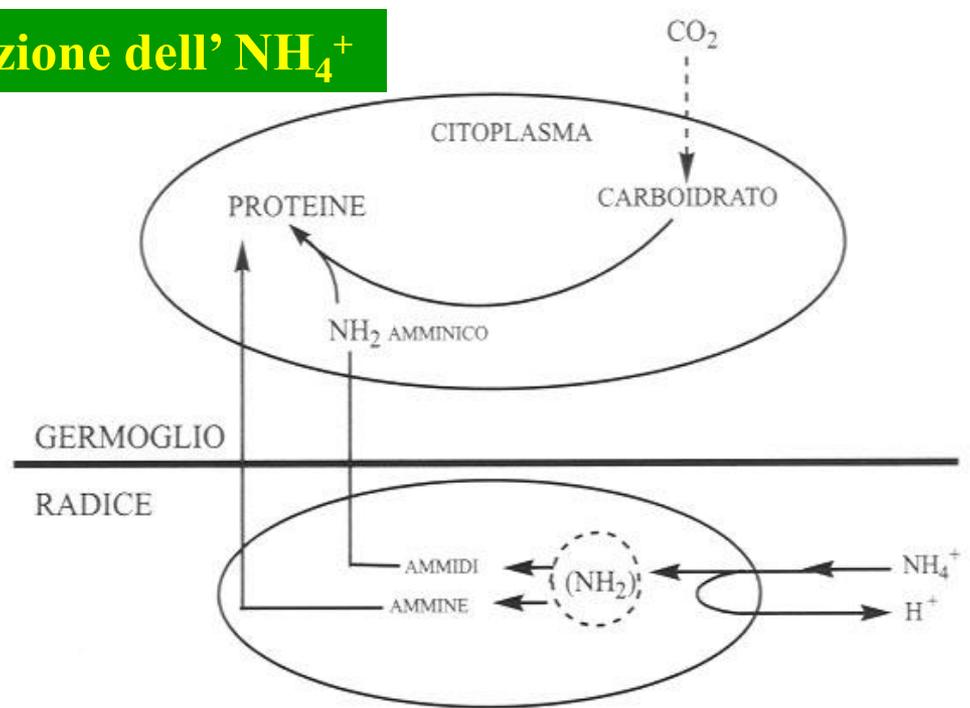
Assimilazione dell' NH_4^+

Se il nitrato può essere accumulato nei vacuoli senza danno $\text{L}'\text{NH}_4^+$ e soprattutto $\text{L}'\text{NH}_3$ sono tossici a basse concentrazioni:

Nel citoplasma $\text{NH}_4^+ < 15 \mu\text{M}$

Nel vacuolo anche

conc + elevate in quanto il basso pH previene la formazione di NH_3



L'assorbimento di NH_4^+ nella radice comporta il rilascio di H^+ per la compensazione di cariche: **antiporto $\text{NH}_4^+ / \text{H}^+$**

- Quasi tutto l' NH_4^+ è assimilato nelle radici: $3 \text{NH}_4^+ \longrightarrow 3 \text{NH}_2\text{-R} + 4 \text{H}^+$

Detossificazione

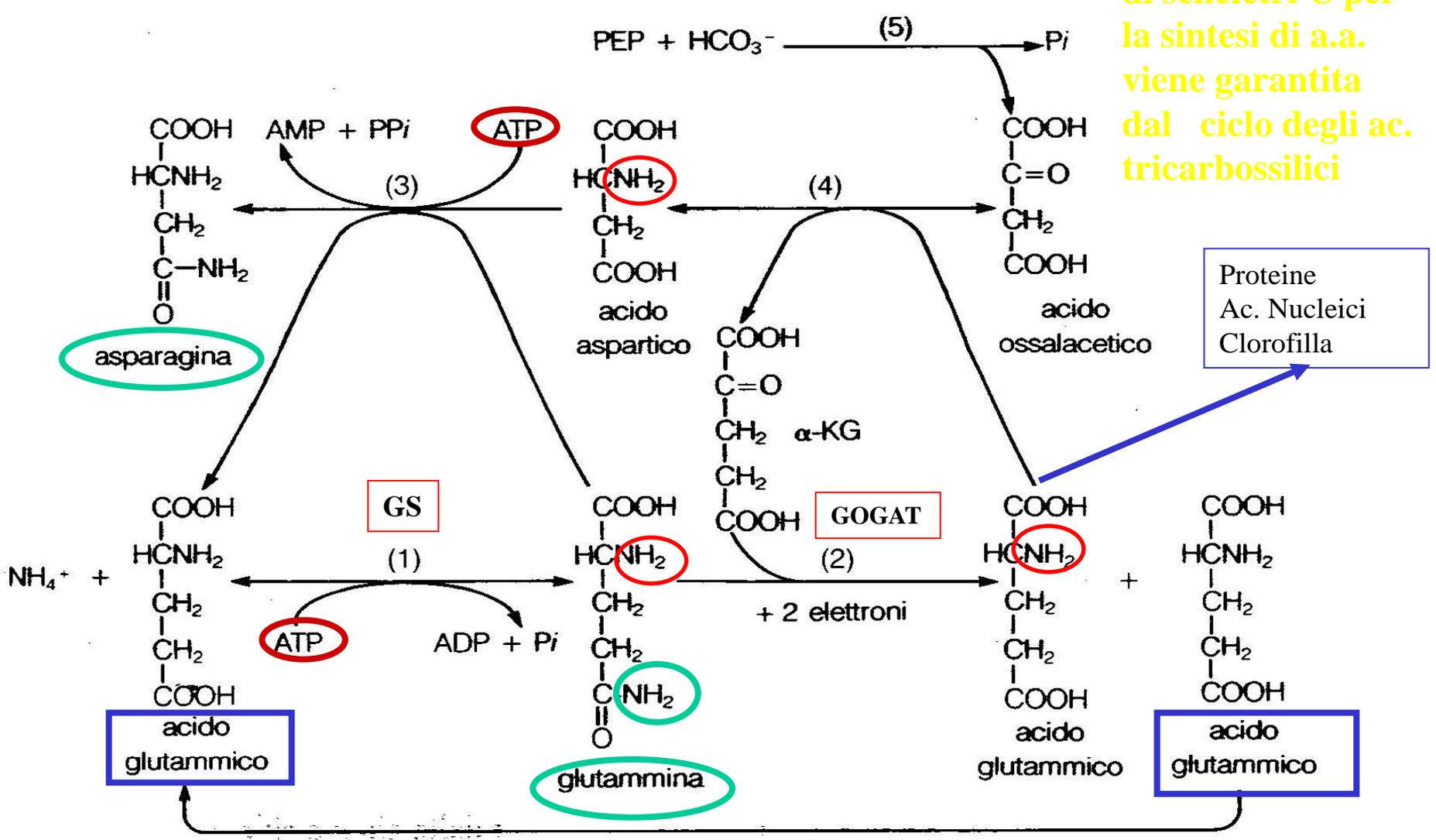
Produzione di H^+ \longrightarrow

rapida formazione di a.a. e amidi

Acidificazione del citoplasma

e aumento dell'invio di H^+ all'esterno

L'elevata richiesta di scheletri C per la sintesi di a.a. viene garantita dal ciclo degli ac. tricarbossilici



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

1. **GS** = glutamina sintetasi
2. **GOGAT** = glutammato sintetasi

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

È ottenuta mediante idrolisi dell'ATP

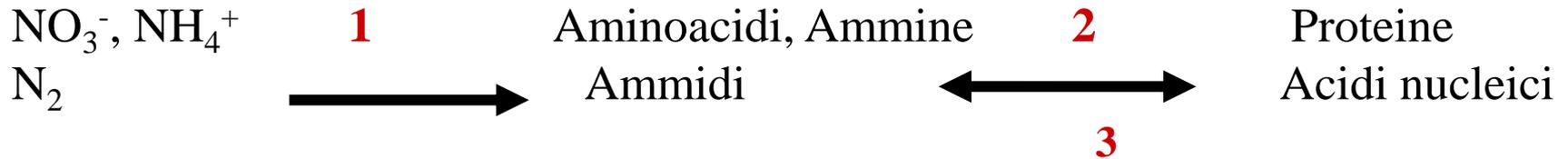
L'N dell'aspartato può derivare dal glutammato

I 4 C derivano dall'ossalacetato

L'asparagina ha le stesse funzioni della glutamina

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

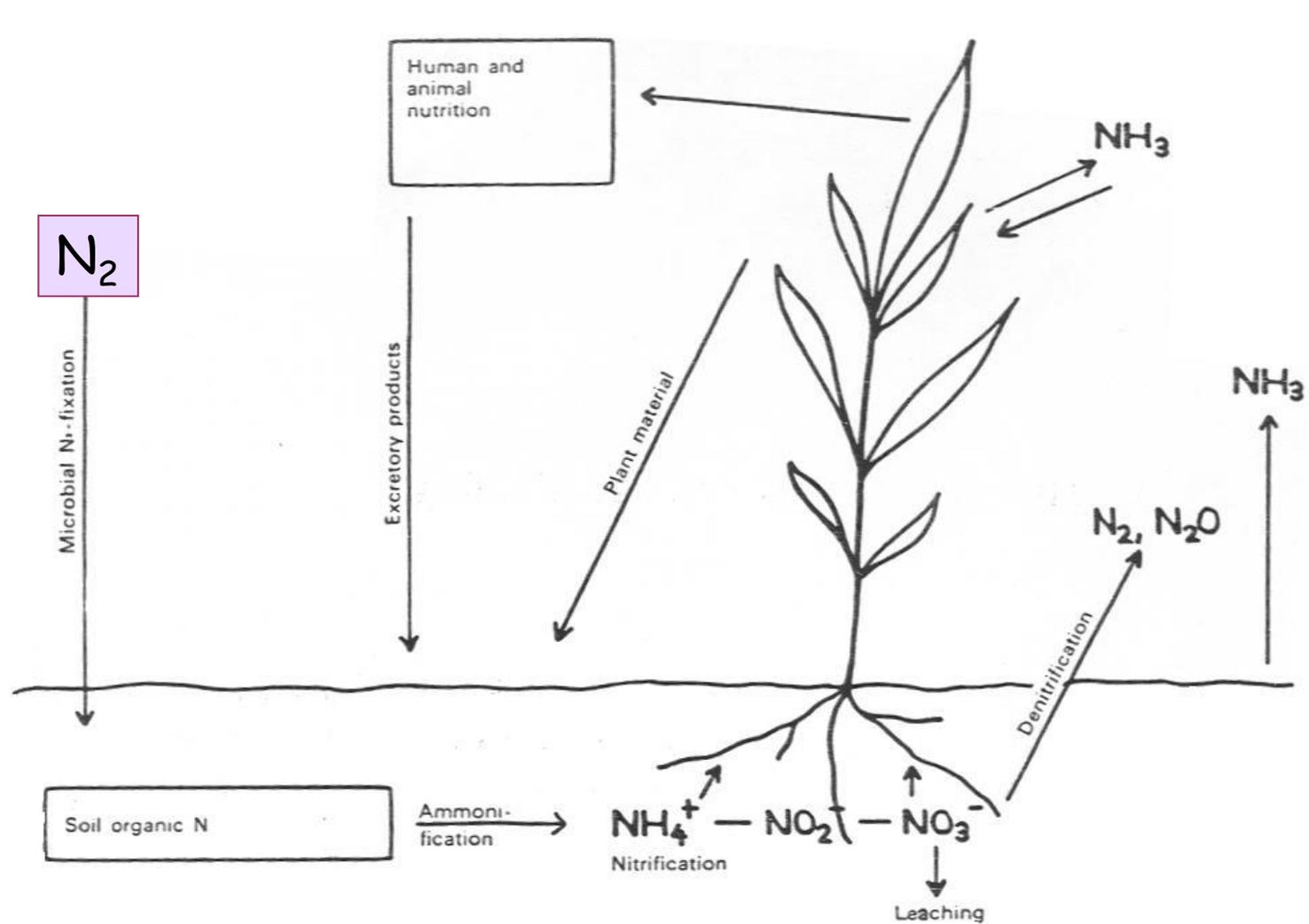
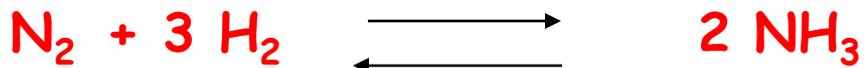
Le 3 frazioni azotate sono influenzate dalla nutrizione:

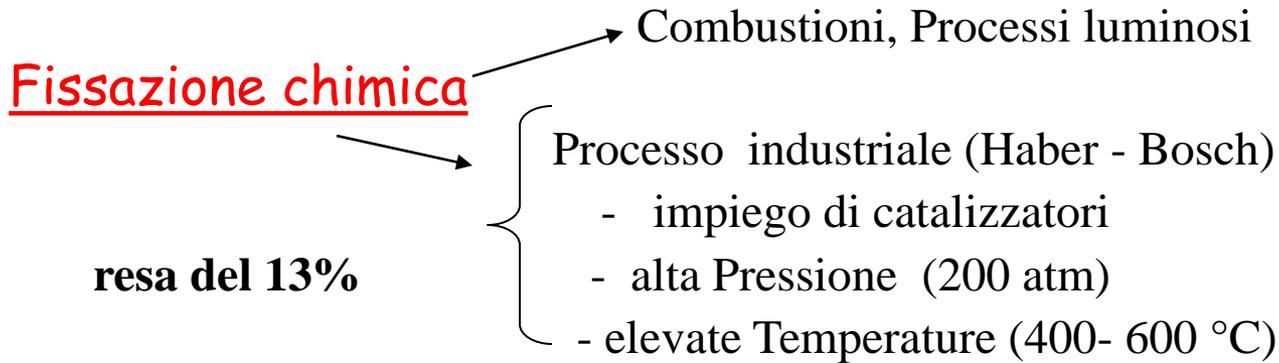
Aumentando il livello di nutrizione azotata

→ Incremento di tutte le frazioni
ma con intensità differente

Fissazione dell'azoto atmosferico

Conversione
di N_2 in
Ammoniaca:





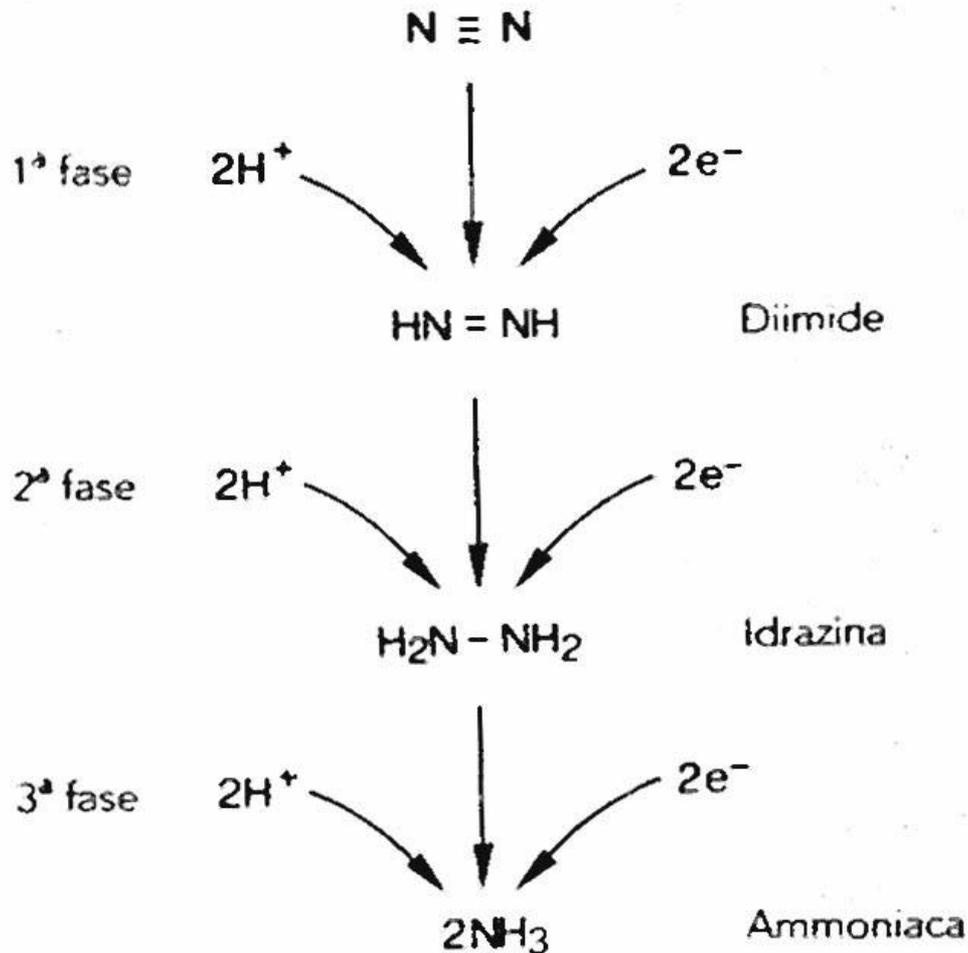
Fissazione biologica ad opera della Nitrogenasi

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

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 :



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

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

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

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

E' un processo
esoergonico

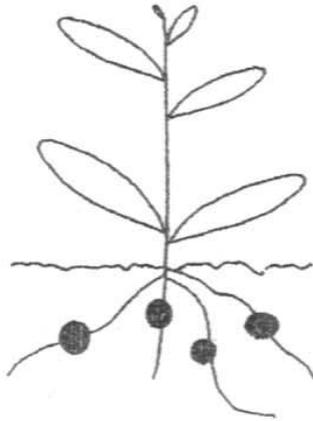
richiede una notevole **energia di attivazione** perché l' N_2 è inerte

N fissazione biologica

3 strategie differenti
per

- 1) fonte energetica utilizzata
- 2) diversa capacità di fissazione

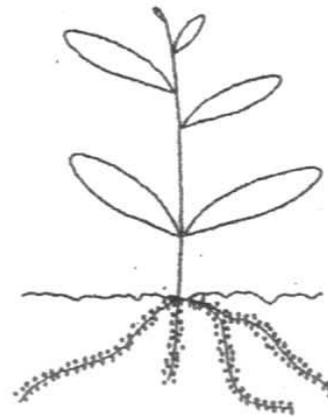
Simbiosi



Carboidrati,
Ac. organici

50- 400

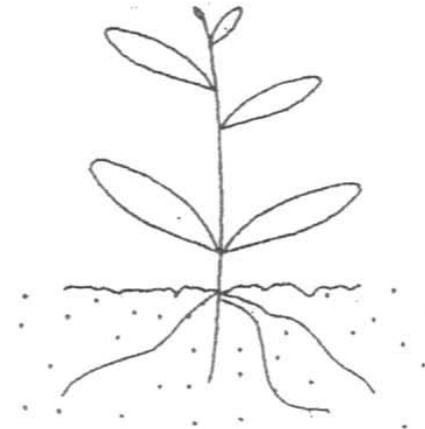
In associazione



Essudati radicali
dall'ospite

10 - 200

Libera



Residui organici
Fotosintesi

1- 50

Fonte
di energia

Kg N fissato/
ettaro/anno

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 substrato di C organico** 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 h ⁻¹)	Shoot dry weight (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 total plant nitrogen
Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	0–35
Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.)	0–47
→ Sugar cane (<i>Saccharum</i> sp.)	2–56 (60–80) ^b
Forage grasses	
<i>Brachiaria humidicola</i>	30–40
<i>Leptochloa fusca</i>	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

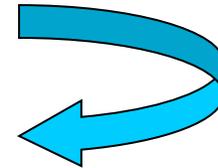
Batteri diazotrofi liberi

• **autotrofi**
(cianofite) → riduzione
fotosintetica di N_2

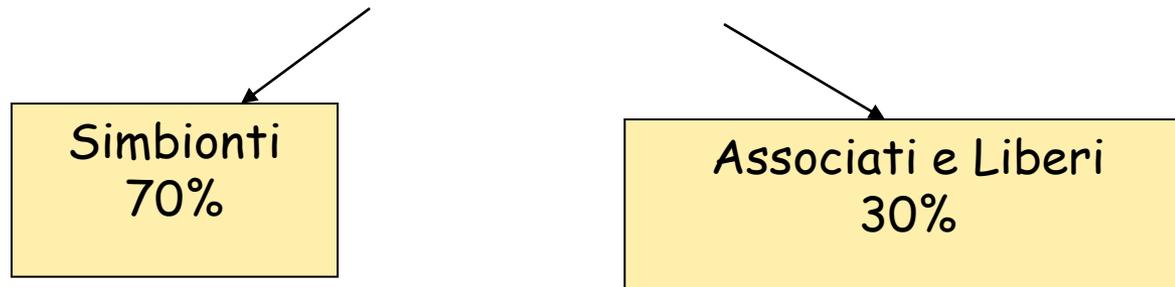
• **eterotrofi**
(azospirillum) → processo non
fotosintetico

inadeguata disponibilità di residui organici nel suolo

limitata attività di azoto- fissazione



Diverso **contributo** dei batteri diazotrofi nel processo di
N-fissazione



Fissazione simbiotica dell'azoto

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

simbiosi altamente specifica:

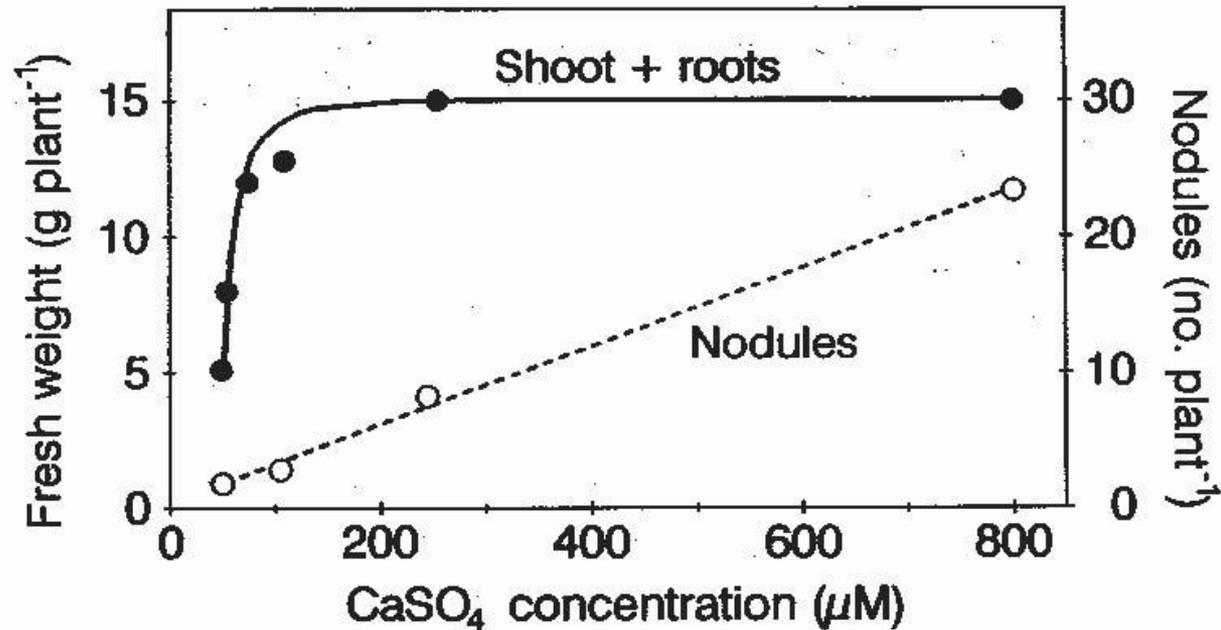
solo certi **ceppi** sono **compatibili** con una data leguminosa per formare **noduli funzionanti**

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

<i>Specie di Rhizobium</i>	<i>Piante ospiti</i>
<i>R. leguminosarum</i>	Pisello, Fava, Lenticchia, Cece
<i>R. trifolii</i>	Trifoglio
<i>R. phaseoli</i>	Fagiolo
<i>R. meliloti</i>	Erba Medica, Fieno greco, Meliloto
<i>R. japonicum</i>	Soia
<i>R. lupini</i>	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: —————> aumento nodulazione
infezione con micorizze

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.

Il processo di inoculazione e sviluppo simbiotico richiede 4

fasi principali:

- 1. Riconoscimento pianta-batterio (*Rhizobium*)**
- 2. Diffusione dell'infezione batterica nelle radici**
- 3. Sviluppo del nodulo radicale e della struttura simbiotica**
- 4. Azoto fissazione e inizio del rapporto simbiotico**

Fasi dell' Infezione da Rhizobium

I^a Tappa dell' infezione: Interazione rizobio- pianta ospite

La **pianta** rilascia **essudati** contenenti flavonoidi e isoflavonoidi



Colonizzazione
chemiotassi



(Molecole segnale riconosciute solo da specie compatibili)



specificità

nel **batterio**:

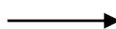
- Attivazione geni nod
- Produzione **fattori nod** + **sostanze ormono-simili** (lectina)



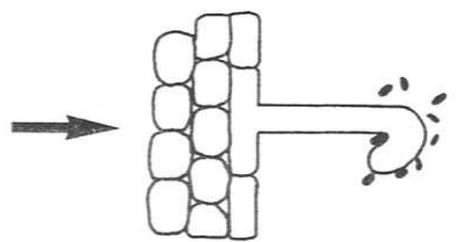
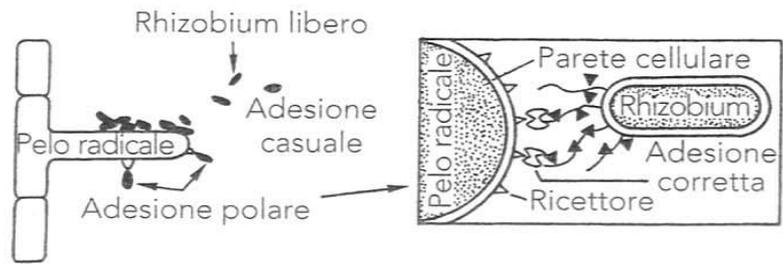
Attacco dei batteri al pelo

Il **Nod** viene emesso dal batterio e si comporta da ormoner stimolando la risposta dell' apparato radicale della pianta. :

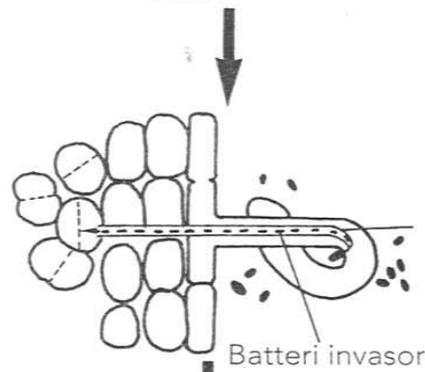
incurvamento del pelo radicale (IAA)
penetrazione filo di infezione



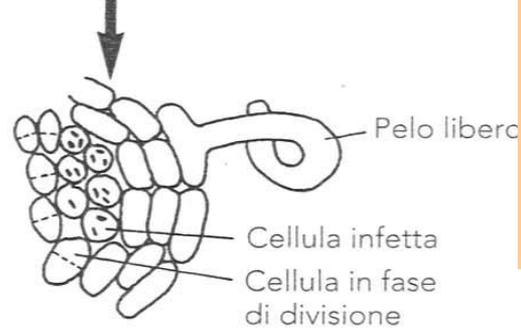
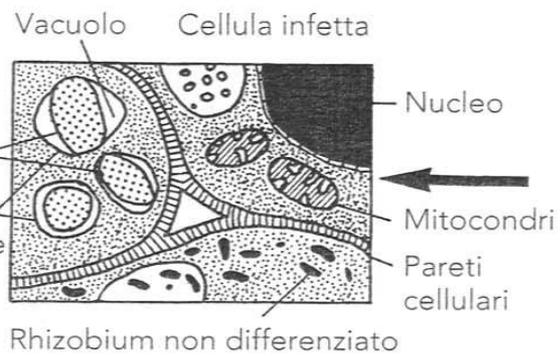
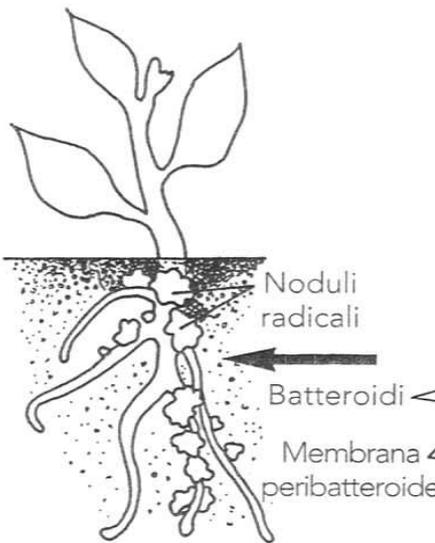
Divisione cellule Corticali

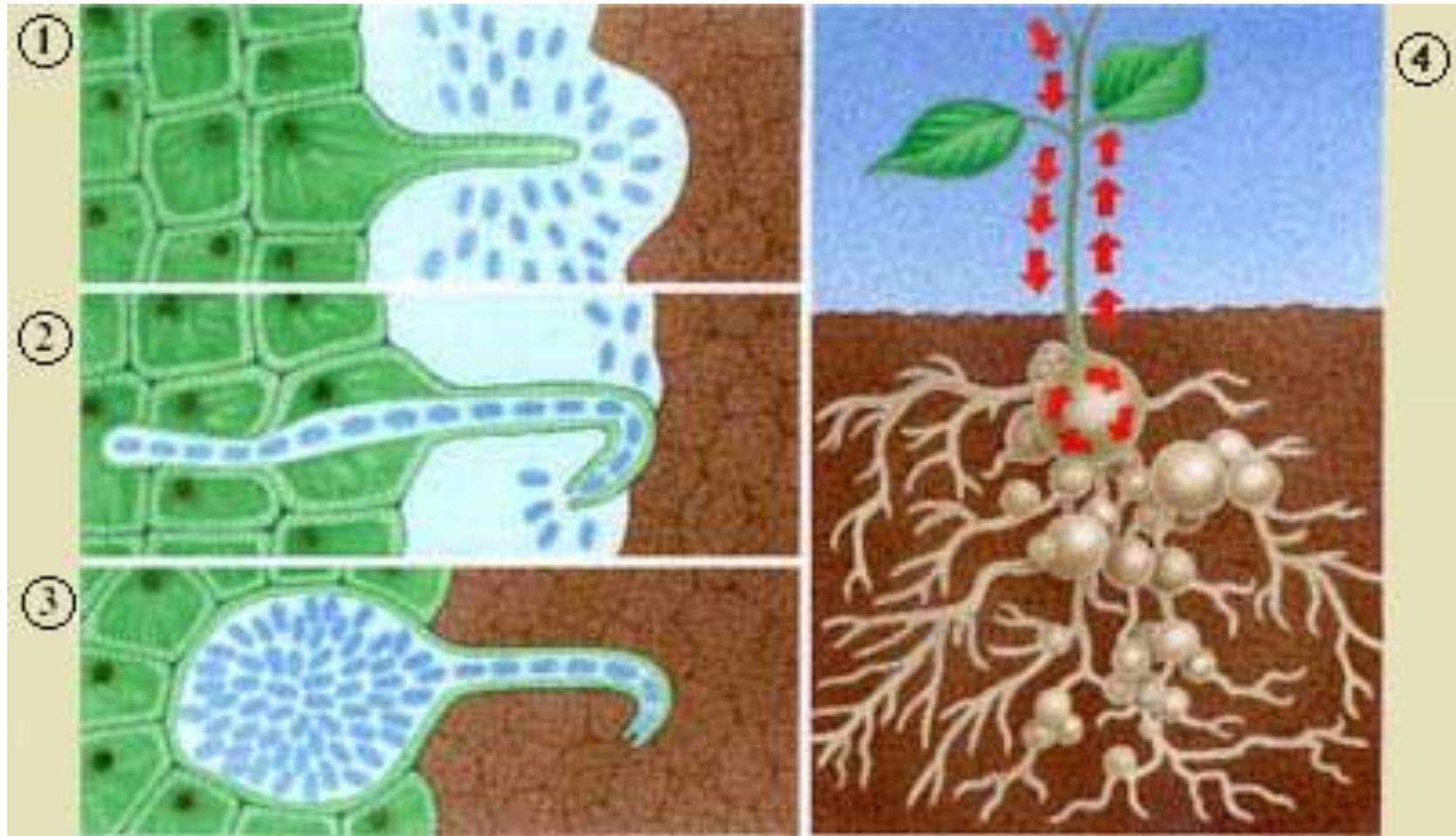


Formazione meristema del nodulo



Batteri →
Batteroidi
• **Sintesi di Leg-Hb**
Nitrogenasi





Raggiunta la concentrazione critica (15000-20000 batteri per ogni singola cellula vegetale infettata) è *la pianta che inibisce la formazione di nuovi noduli mediante una inibizione dell'ormone **Nod** che rappresenta il regolatore della divisione cellulare del batteroide: diminuendo la concentrazione di Nod si inibisce la riproduzione del "Rhizobium".*

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:

1) Rifornimento adeguato di fotosintati ai batteroidi dei noduli

quantità di C impiegato è variabile:

6-12g di C per g di N fissato

{ 36-39% per la nodulazione
50% per l'attività di nitrogenasi
16-22% per l'assimilazione dell'N ridotto

2) Mantenimento di basse concentrazioni di O₂ nei noduli

3) Rapida esportazione dell'N fissato : traslocazione nodulo-pianta

Sistema di regolazione della pO_2
a livello cellulare



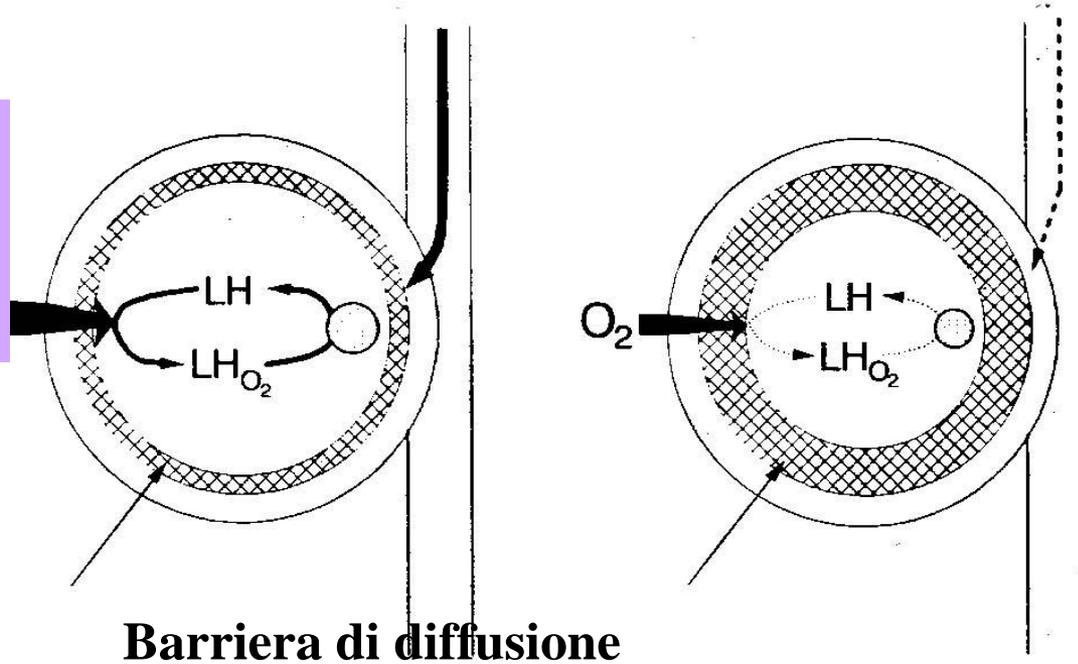
- Elevata domanda di energia (ATP)
- Protezione della nitrogenasi

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

Floema (saccarosio)

Nodulo attivo

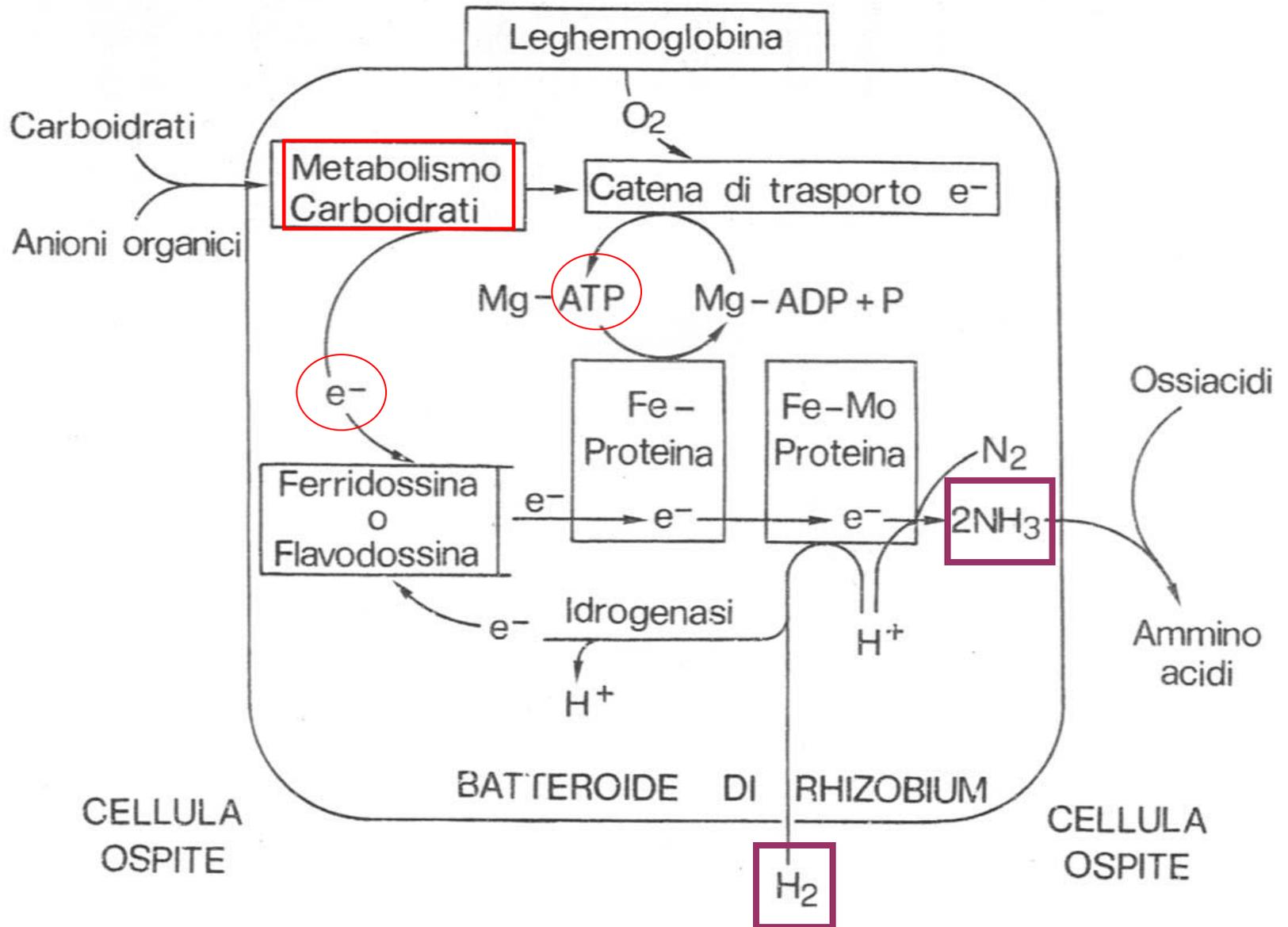
Spazi intercellulari con aria



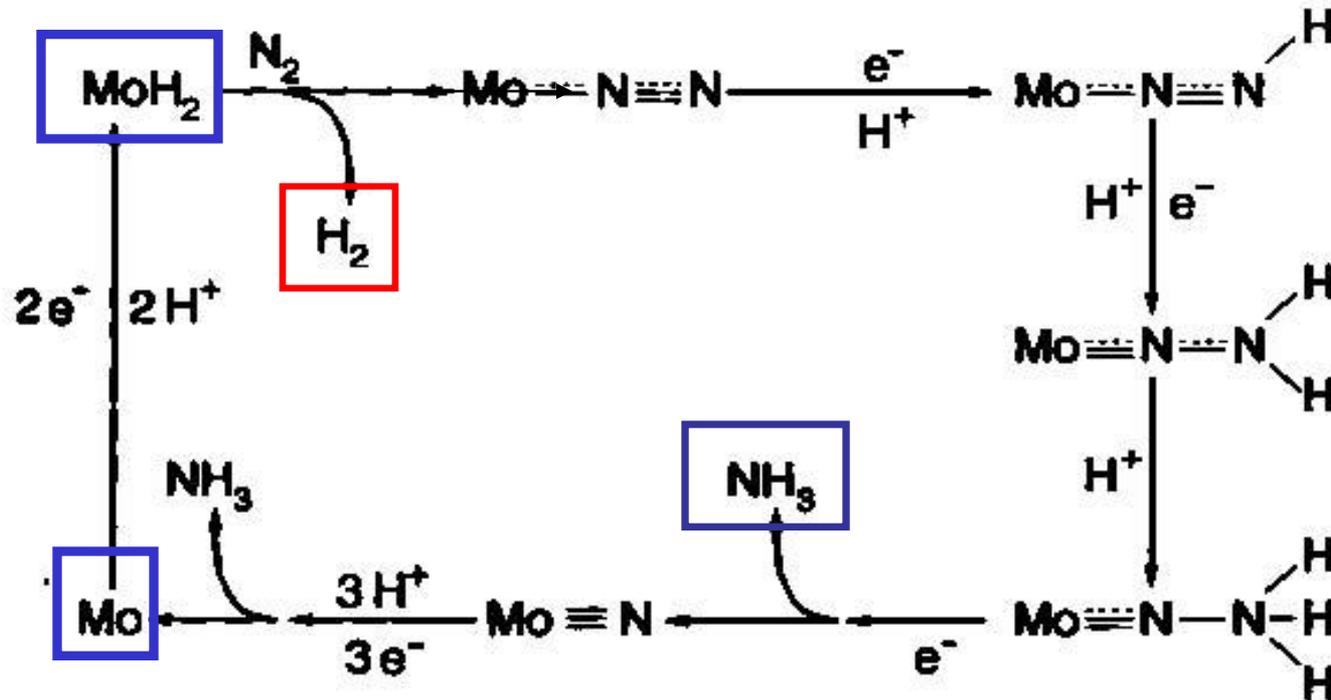
Nodulo non attivo

Spazi intercellulari con H_2O

Barriera di diffusione



La protonazione del Mo è una tappa richiesta affinché l' N_2 si leghi alla proteina \longrightarrow *rilascio di H_2*



Stechiometria della reazione



12 ATP per il sistema nitrogenasi + **4 ATP** per formazione di H_2

- L' N fissato è rilasciato come NH_3 dal batteroide al citosol per semplice **diffusione** attraverso la membrana peribatteroide

- passaggio rapido:

elevata NH_3 nel batteroide \longrightarrow inibizione della nitrogenasi

- *nel citosol:*

assimilazione dell' NH_3 via GS / GOGAT

