

# AZOTO

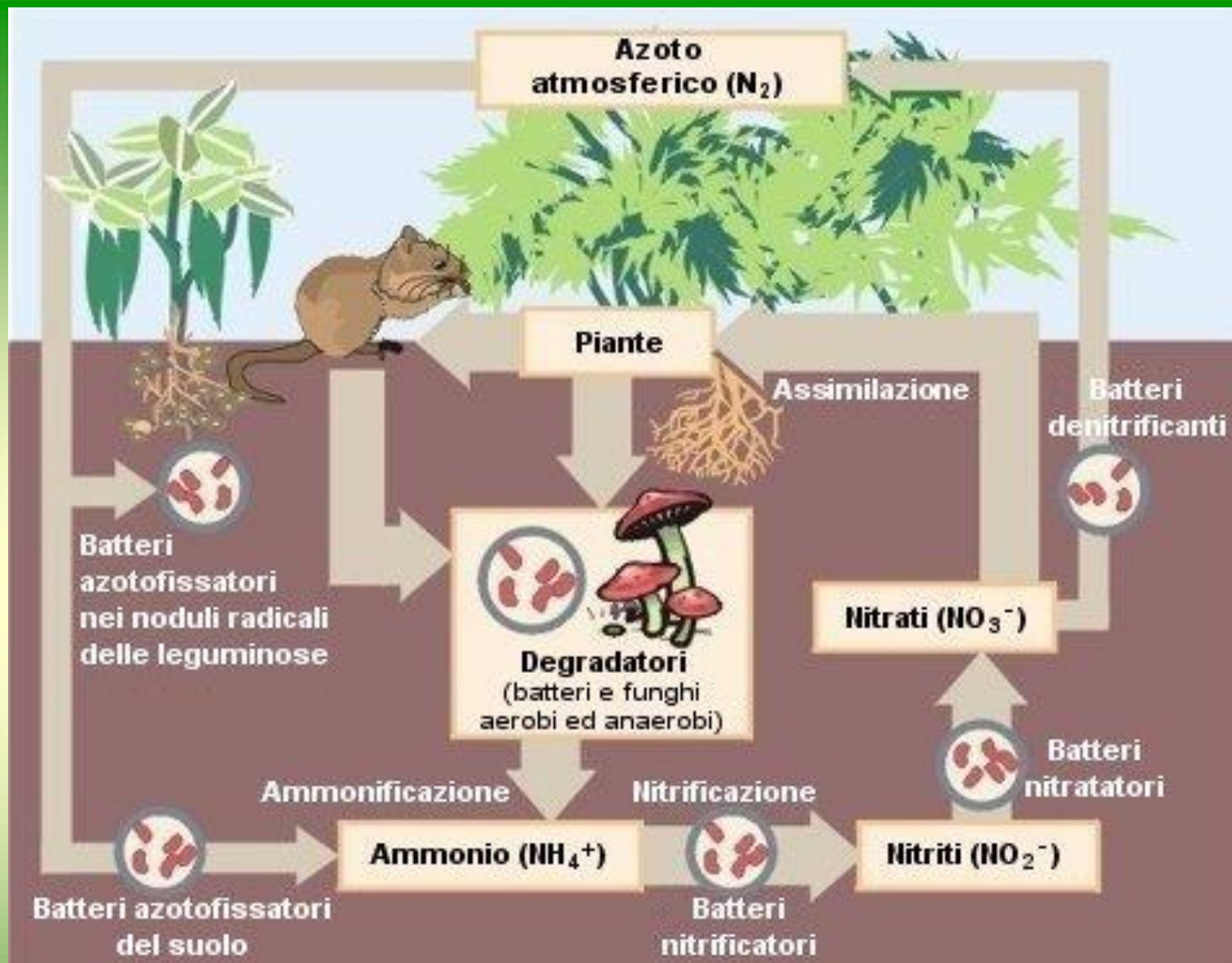
- L'azoto è ampiamente diffuso in natura
- È molto mobile
- Il contenuto maggiore è nella *litosfera* in combinazioni non ben definite.
- Una frazione ridotta nel suolo direttamente assorbibile dalle piante

{  
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

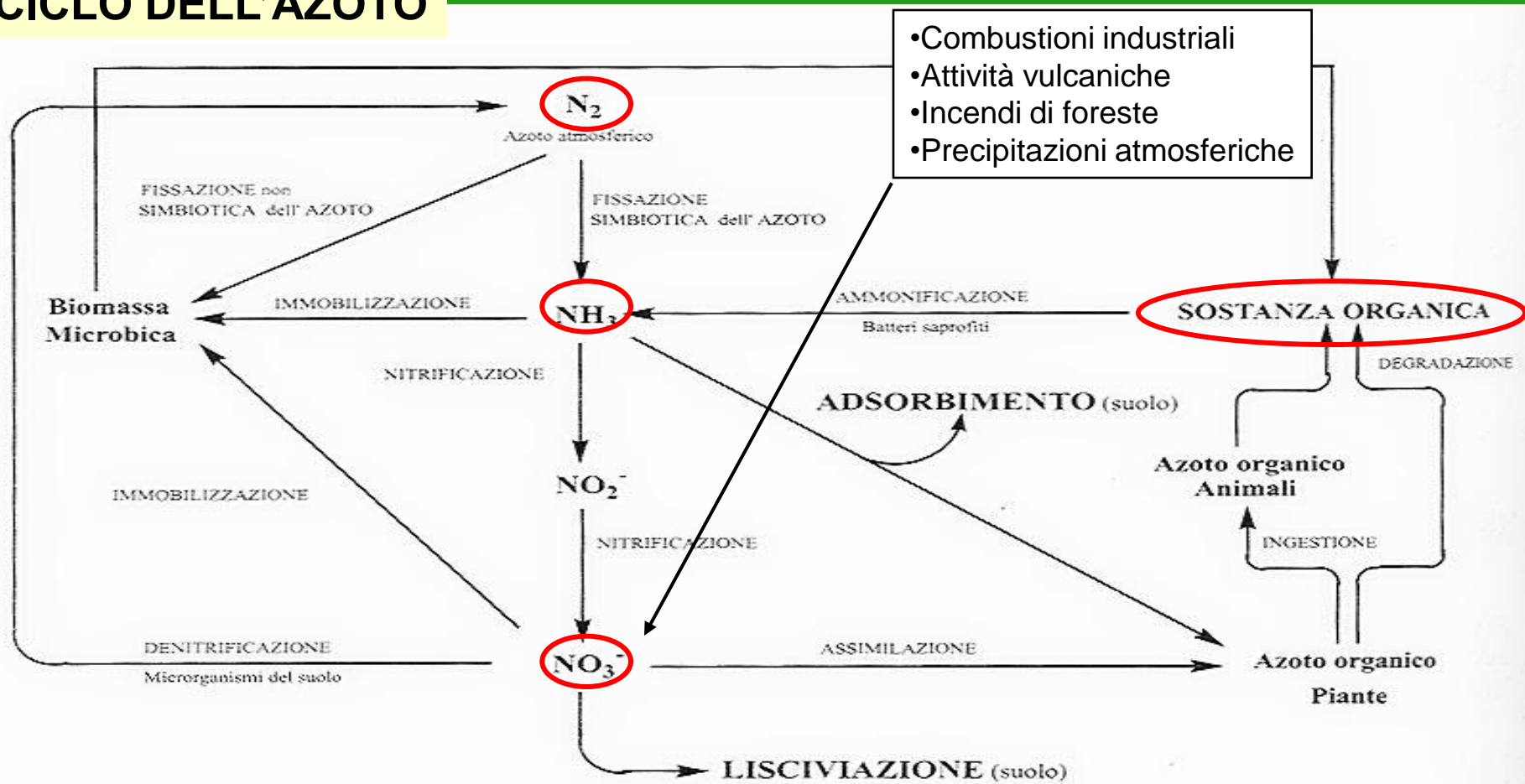
Nel comparto *ambientale terrestre* si ha la prevalenza delle **forme organiche** su quelle inorganiche a differenza di quello acquatico .



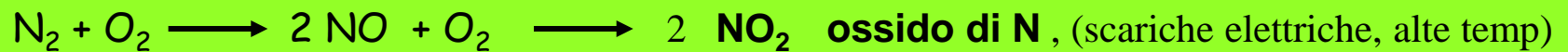
La concentrazione dei nitrati nei suoli agrari: 0,5-10 mM

L'ammonio è da 10 a 1000 volte meno presente: concentrazione  $\mu M$

# CICLO DELL'AZOTO



## Precipitazioni atmosferiche:



reagisce spontaneamente con  $H_2O$



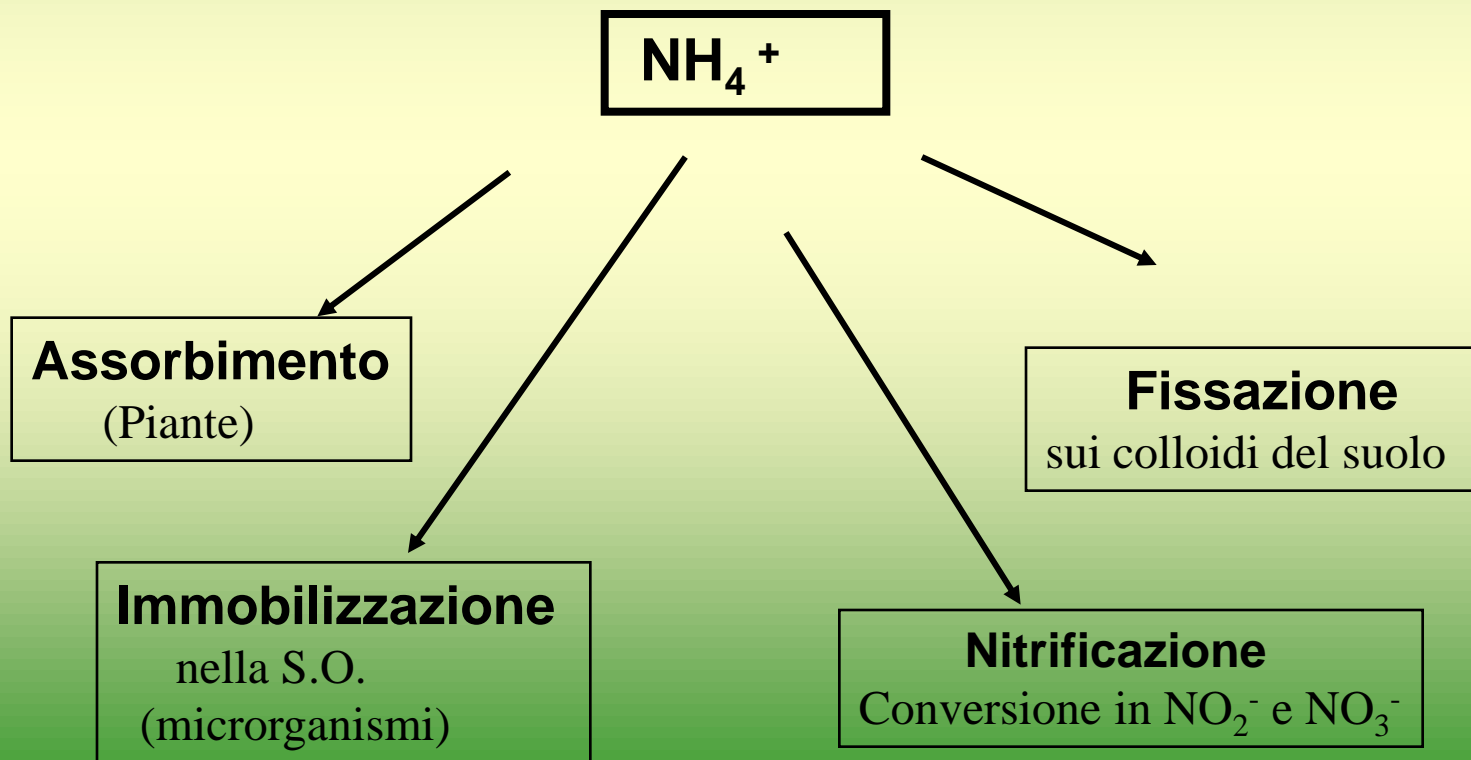
**10- 20 Kg/ ha / anno** proviene da tali fonti

**NH<sub>3</sub> è un gas a temp ambiente**



**A pH ~ 7 la [NH<sub>3</sub>] 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<sup>a</sup>

pH	Nitrogen source (mM)		Ammonia <sup>b</sup>	Assimilation rate (mg CO <sub>2</sub> dm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Transpiration rate (g H <sub>2</sub> O dm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
	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

<sup>a</sup>Based on Schenk and Wehrmann (1979).

<sup>b</sup>Calculated NH<sub>3</sub> concentration in the aqueous solution.

A **pH > 7** → l' NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assorbito risulta fitotossico → Aumento rapido della NH<sub>3</sub>

A pH neutro-acido molte specie tollerano elevate concentrazioni di NH<sub>4</sub><sup>+</sup>



**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,  $\text{NO}_3^-$** , **2 sistemi:**

1. **Sistema ad alta affinità**, di due tipi:

- **dovuto a un trasportatore costitutivo ad alta affinità (CHATS)** caratterizzato da bassa velocità di trasporto e saturazione a basse concentrazioni di nitrato
- **dovuto a un carrier inducibile (HATS)** efficiente a basse concentrazioni ( $< 1 \text{ mM}$ ), con flusso basso e saturabile

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

Attività dell' $\text{H}^+$ -ATPasi  $\longrightarrow$  *Gradiente protonico*

$\longrightarrow$  Cotrasporto  $2\text{H}^+ / \text{NO}_3^-$

( e rilascio di  $\text{OH}^-$ -derivante dalla riduzione del  $\text{NO}_3^-$  )

- Per lo ione **AMMONIO**,  $\text{NH}_4^+$ :

## 2 Sistemi costitutivi di assorbimento

- **Saturabile ad alta affinità (HATS)** attivo a basse concentrazioni di ammonio. E' il maggiore responsabile, considerate le basse concentrazioni dello ione nel suolo ( $\mu\text{M}$ )

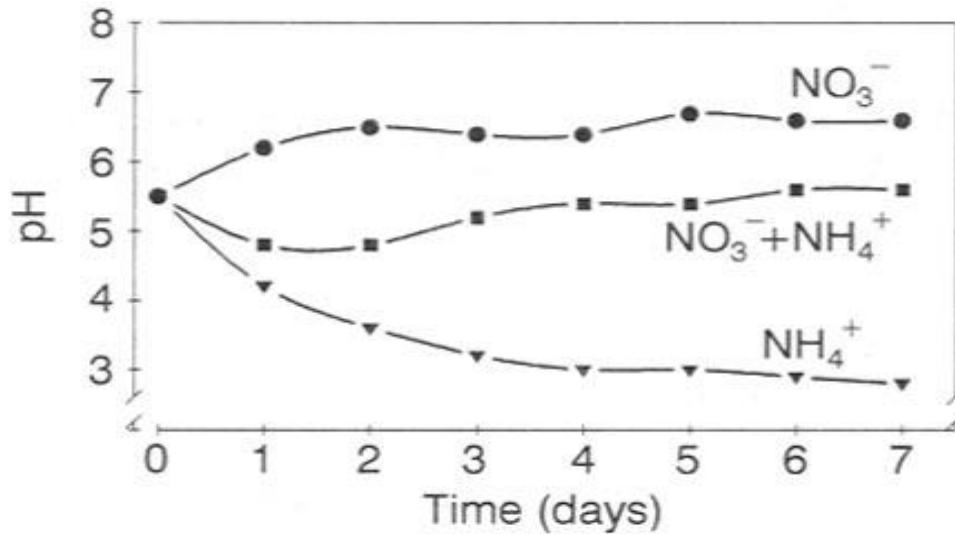
- **Lineare a bassa affinità con  $\text{NH}_4^+ > 1\text{mM}$**  probabile utilizzo degli stessi canali che trasportano  $\text{K}^+$

assorbimento di  $\text{NH}_4^+$  in seguito all'efflusso di  $\text{H}^+$  (antiporto )  
(e rilascio di  $\text{H}^+$  prodotti nel processo di assimilazione dell'  $\text{NH}_4^+$  )

- Assorbimento dell' **AMMONIACA**,  $\text{NH}_3$  :

**Diffusione** attraverso lo strato lipidico

*Favorita da elevati pH all'esterno della radice*



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

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

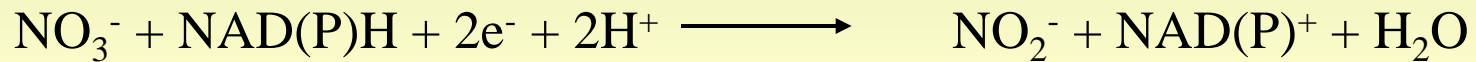


# ASSIMILAZIONE $\longrightarrow$ RIDUZIONE DEL NITRATO

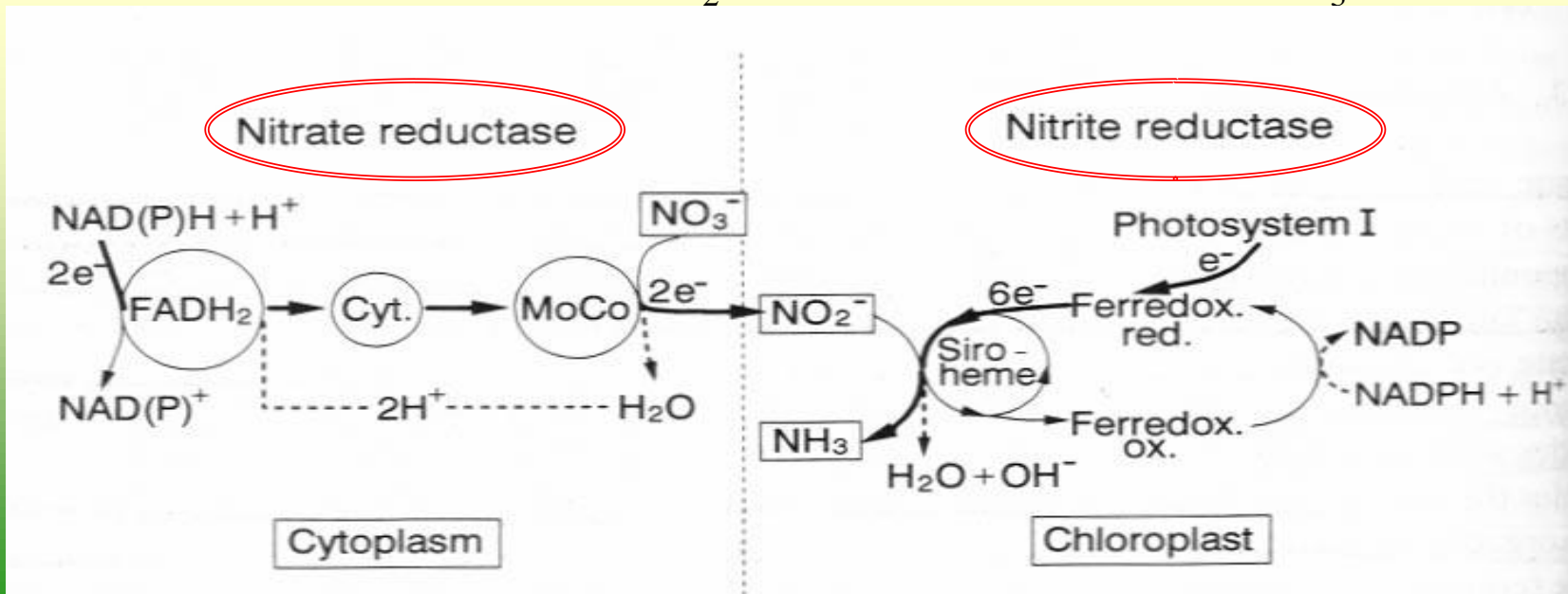


2 Enzimi lavorano in serie:

- La Nitrato reduttasi NR



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




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

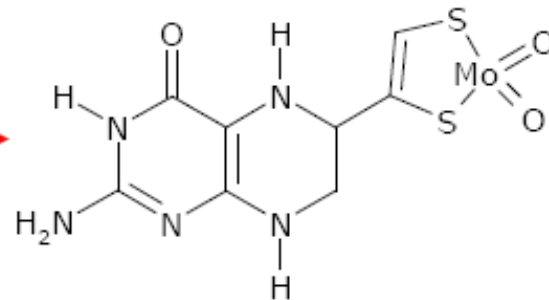
- specie vegetale,
- età della pianta,
- concentrazione di  $\text{NO}_3^-$  esterno

### In generale:

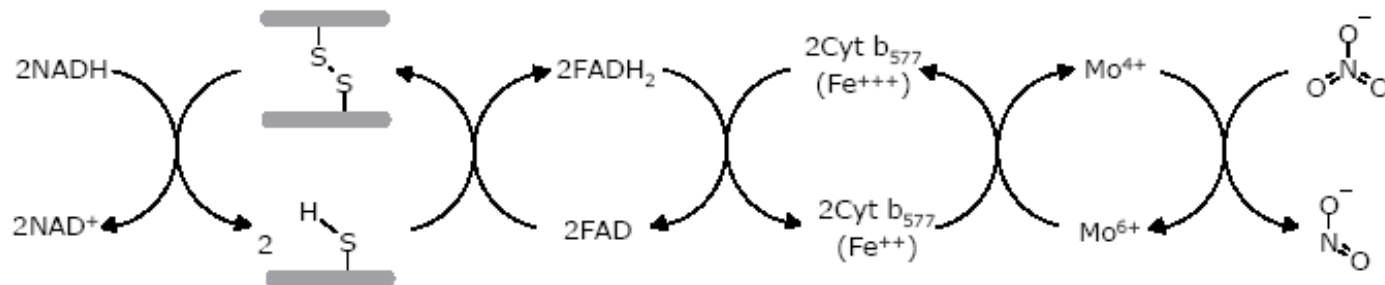
- Quando il rifornimento esterno di nitrato è basso  
→ Un'elevata quantità è organicata nelle radici  
Elevata concentrazione di a.a. nel succo xilematico
- All'aumentare della concentrazione esterna di nitrato:  
→ Una proporzione crescente di  $\text{NO}_3^-$   
viene traslocato alle foglie nello xilema

## 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:



## La Nitrato reduttasi NiR

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

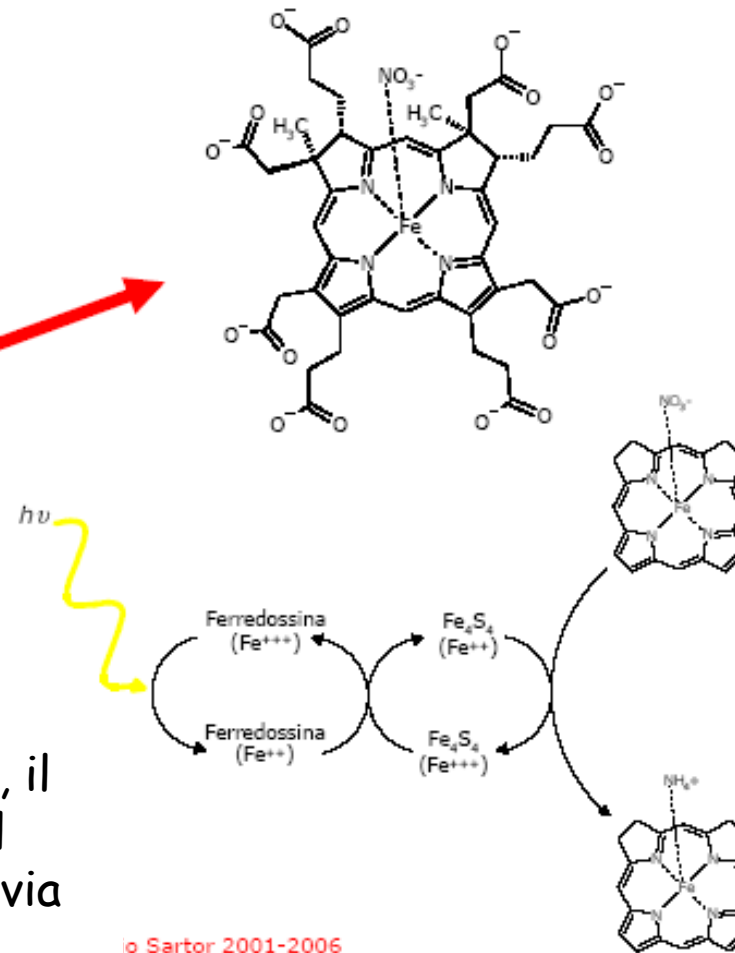
La presenza di  $\text{NO}_3^-$  nel citosol  $\longrightarrow$  aumento della sintesi dell'E.  $\longrightarrow$  Incremento di attività dell'E.

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

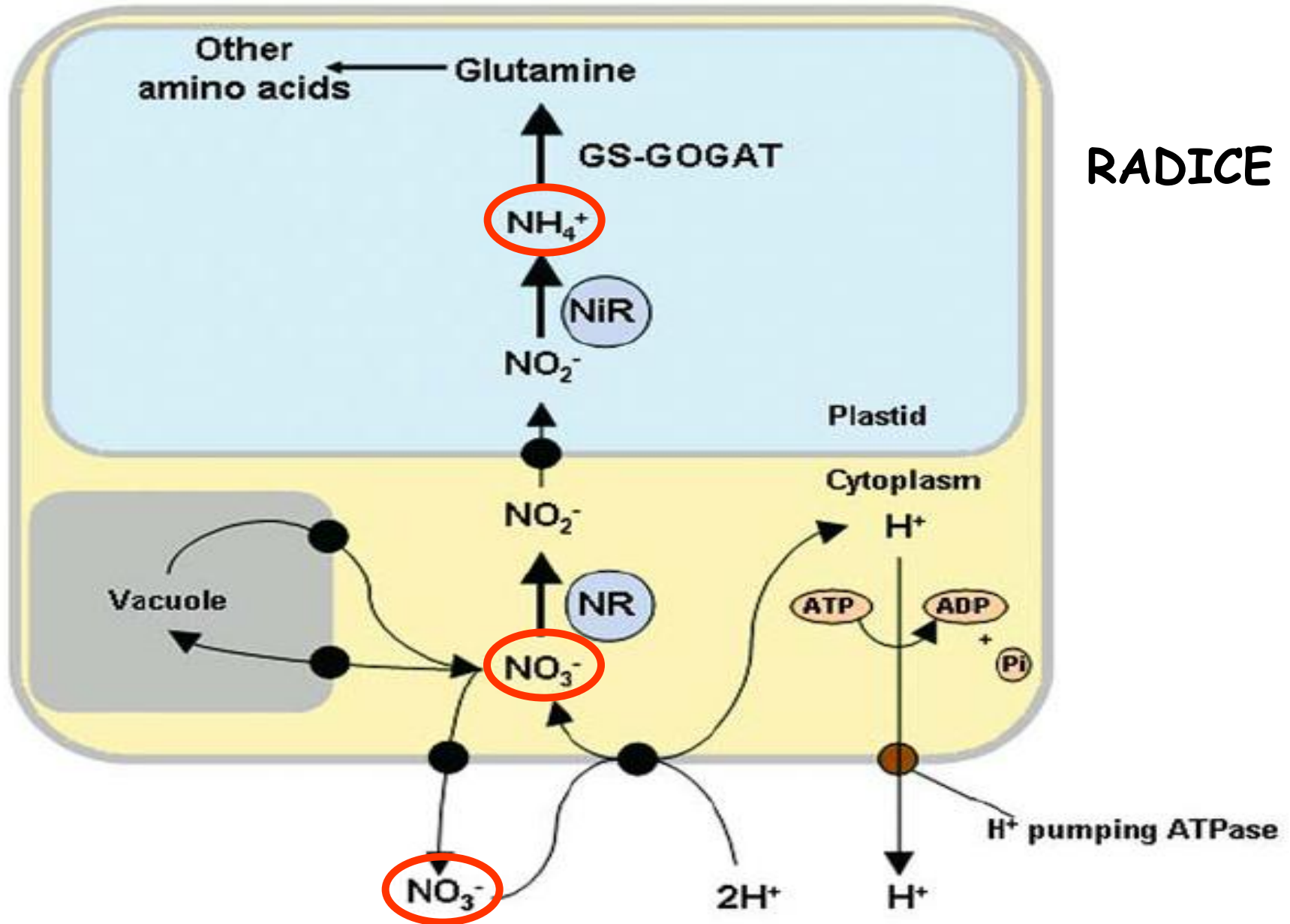
- Ha un **veloce turnover** :  $\longrightarrow$  continua sintesi e degradazione

## 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.



Nei tessuti non fotosintetici, il donatore di e<sup>-</sup> per la NiR è il NADPH prodotto durante la via dei pentoso fosfati



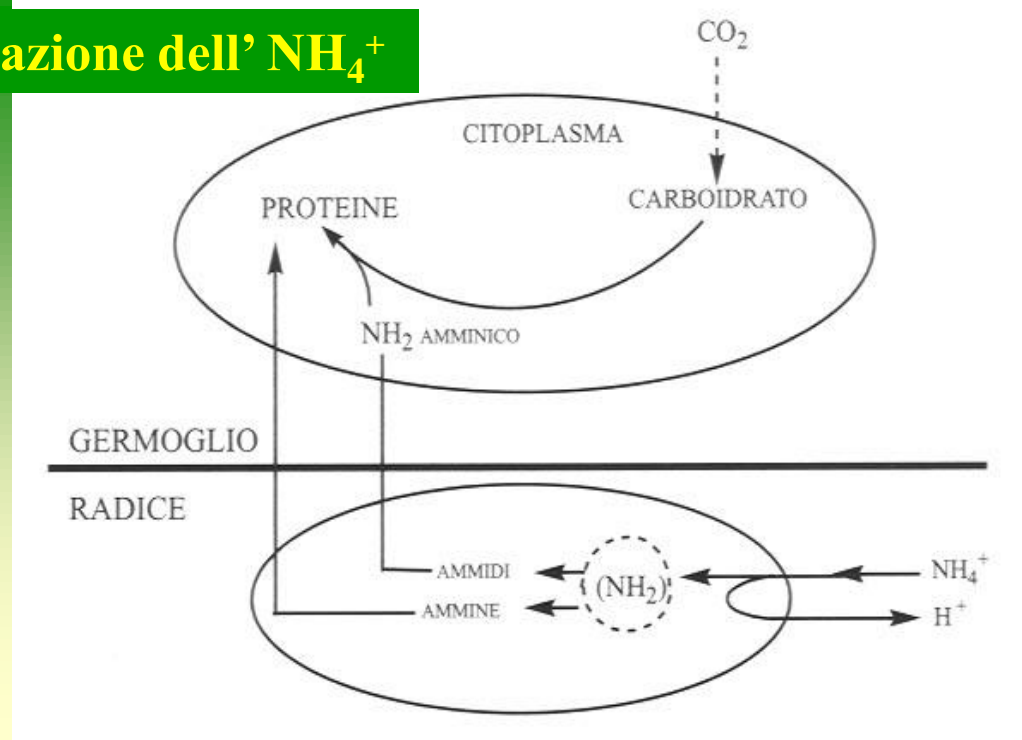
RADICE

## Assimilazione dell' $\text{NH}_4^+$

L'  $\text{NH}_4^+$  e l'  $\text{NH}_3$  sono tossici a basse concentrazioni:

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

Nel vacuolo conc + elevate  
il basso pH previene la  
formazione di  $\text{NH}_3$



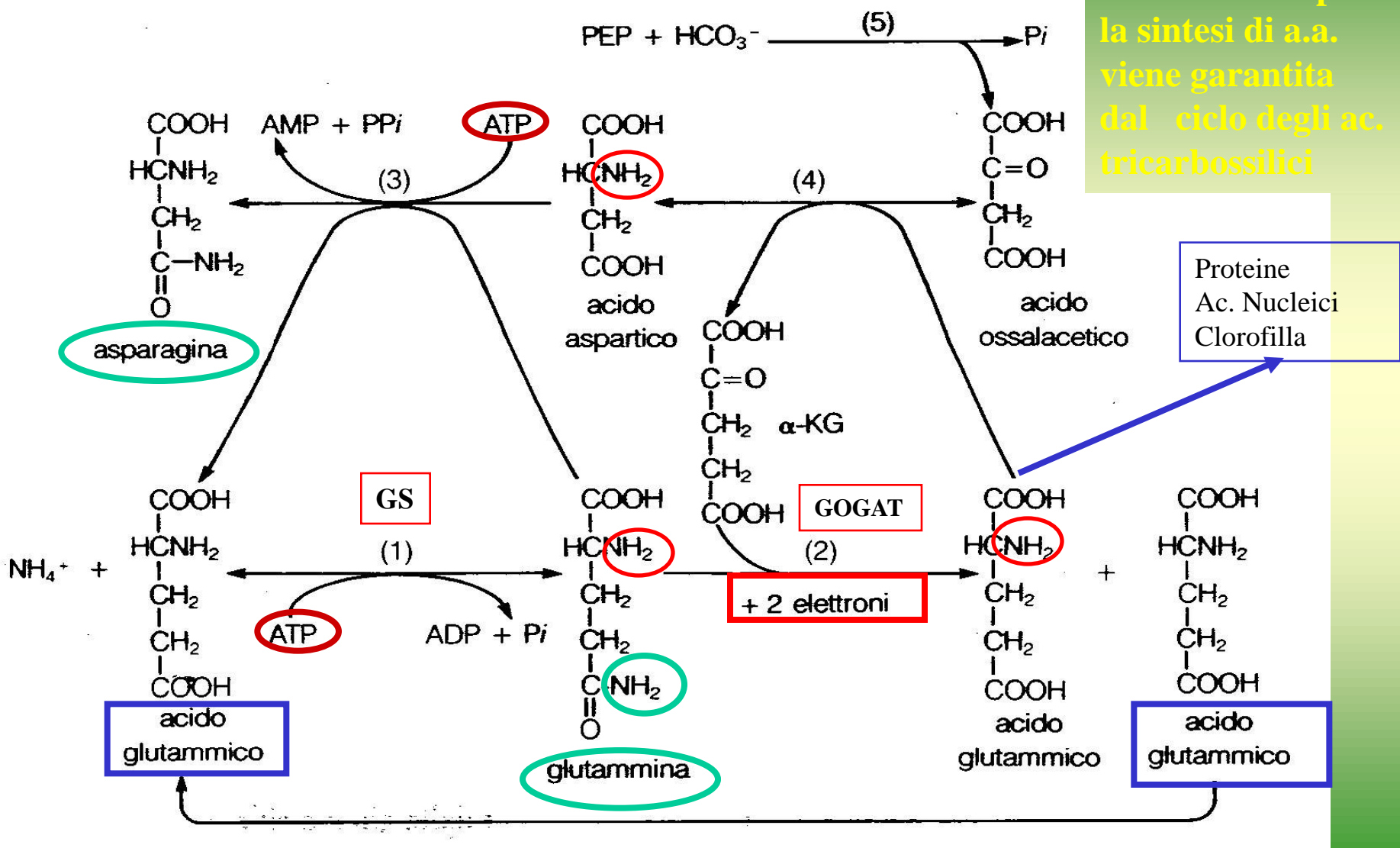
Quasi tutto l'  $\text{NH}_4^+$  è assimilato nelle radici:

**Detossificazione** → rapida formazione di a.a. e amidi

**Produzione di  $\text{H}^+$**  → Acidificazione del citoplasma  
e **aumento dell'invio di  $\text{H}^+$  all'esterno**

# Processi di ORGANICAZIONE

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** con elevata affinità per l'ammonio
2. **GOGAT** = **glutammato sintetasi** :trasferimento di un  $-NH_2$  dalla glutamina  $\alpha$  ketoglutarato che è prodotto nel ciclo di Krebs, con richiesta di  $e^-$  che vengono da Fd (Fd-GOGAT)nei cloroplasti o NADH (NADH-GOGAT) nei plastidi dei tessuti non fotosintetici.

La Fd-GOGAT del cloroplasto ha anche il compito di ri-organicare  $NH_4$  proveniente dall'attività fotorespiratoria.

L'**asparagina** è la 2<sup>a</sup> ammido importante per le piante in particolare nelle leguminose originarie dei climi temperati

È ottenuta mediante idrolisi dell'ATP

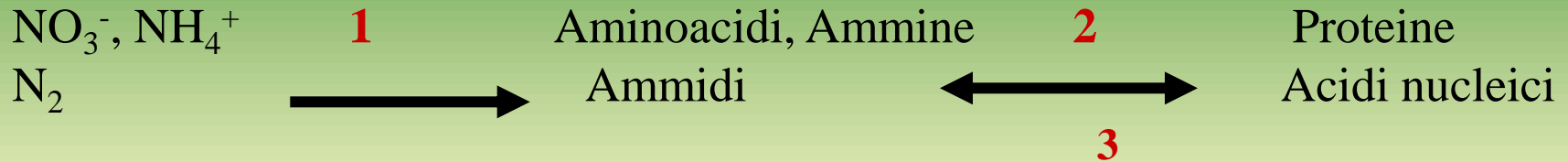
I 4 C derivano dall'ossalacetato

L'N dell'aspartato può derivare dal glutammato

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

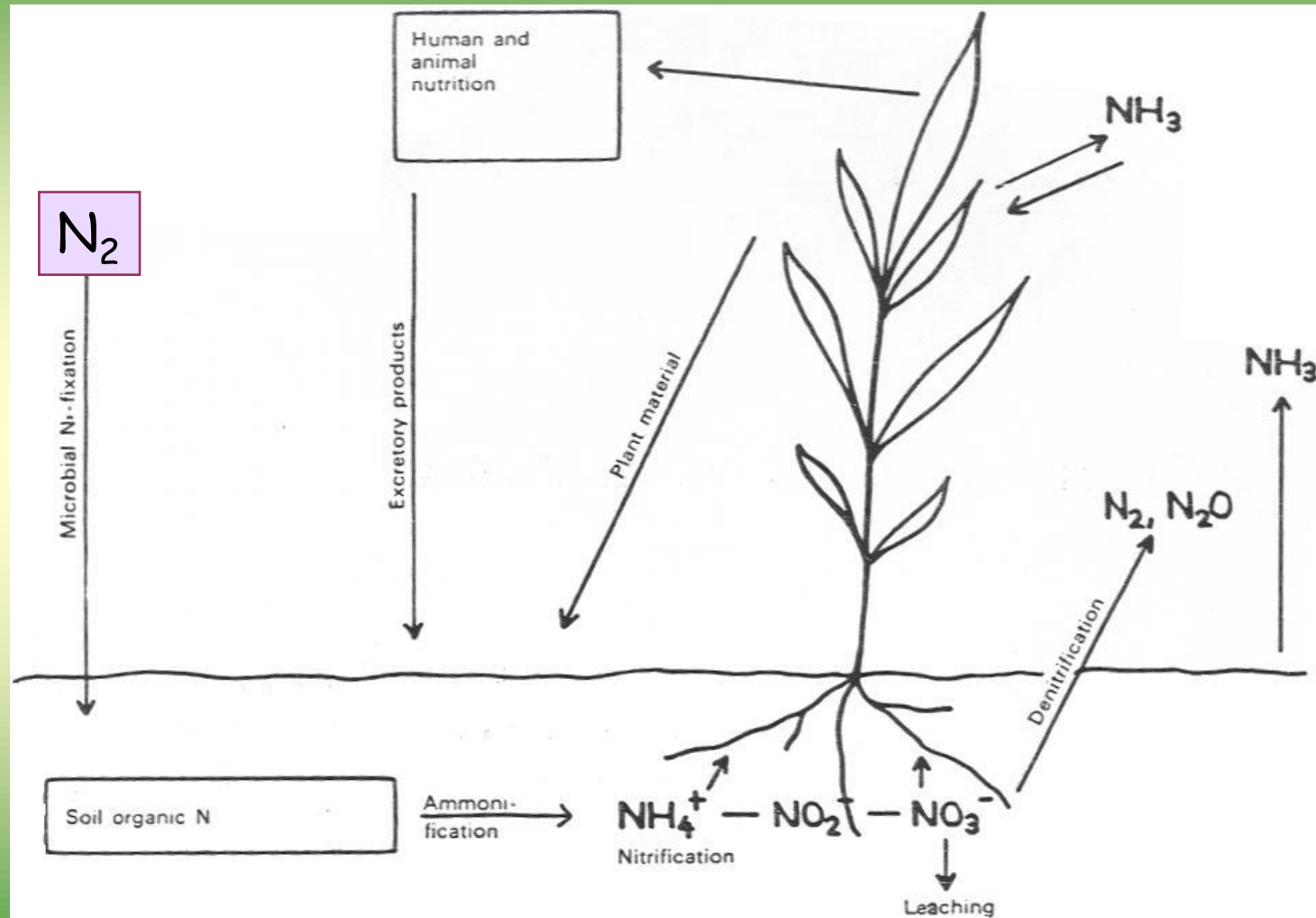
Le 3 frazioni azotate sono influenzate dalla nutrizione:

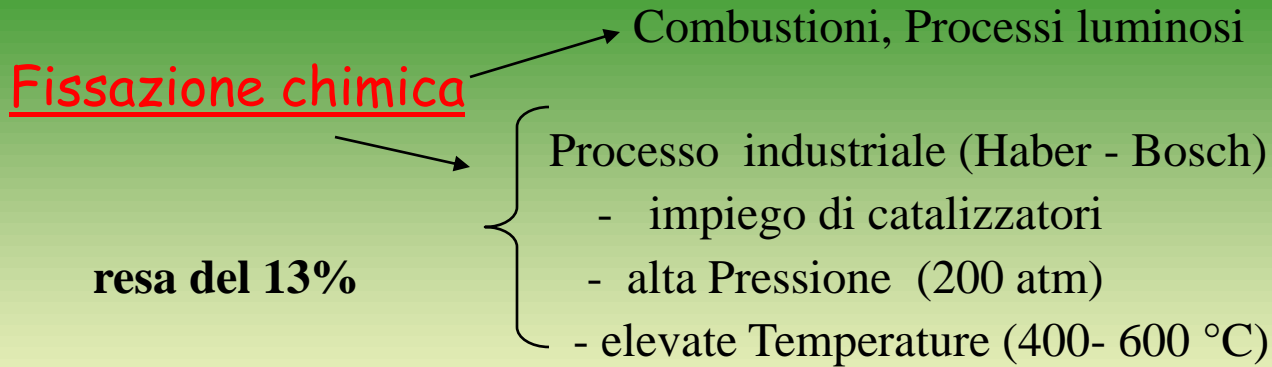
**Aumentando** il livello di nutrizione azotata

→ Incremento di tutte le frazioni  
ma con intensità differente

# Fissazione dell'azoto atmosferico

Conversione  
di  $N_2$  in  
Ammoniaca:





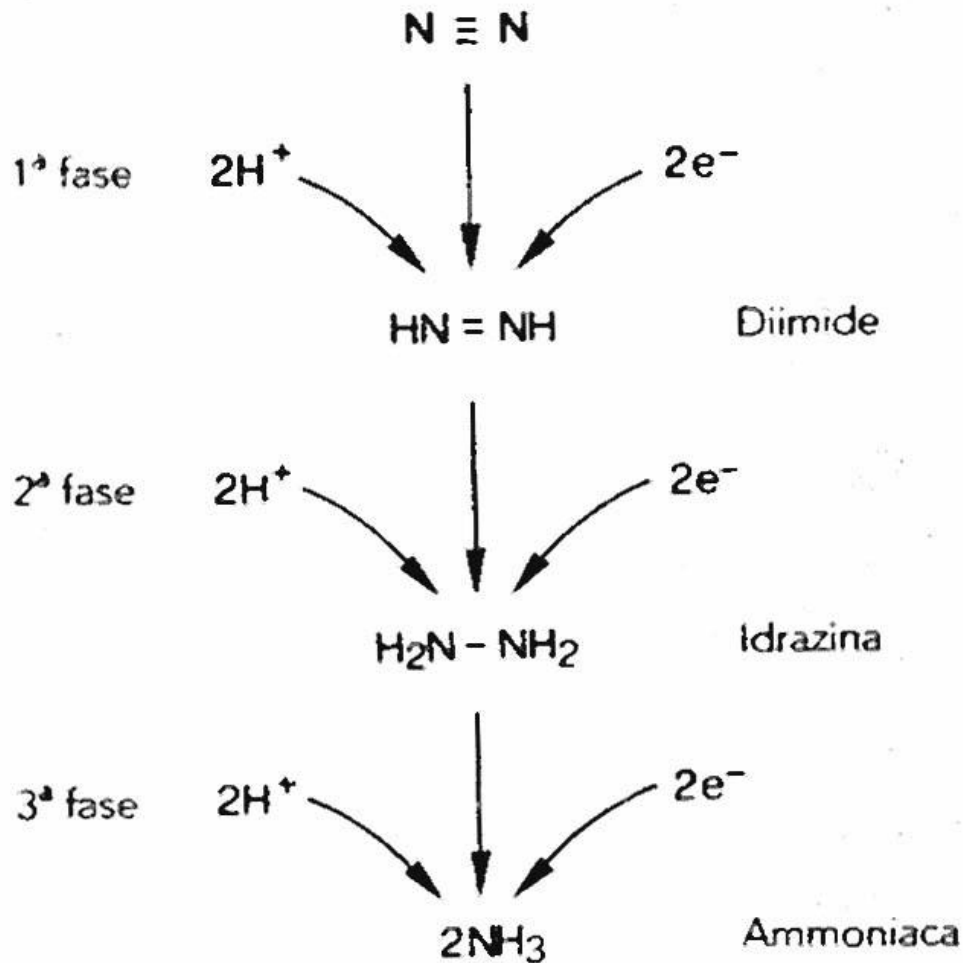
Fissazione biologica ad opera della Nitrogenasi

- 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 :



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

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

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

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

E' un processo  
esoergonico

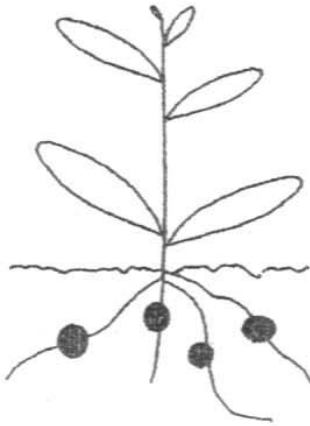
richiede una notevole **energia di attivazione** perché l' $\text{N}_2$  è inerte

# N fissazione biologica

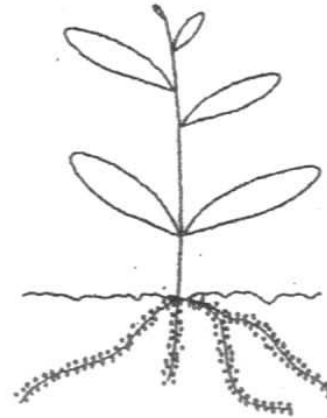
3 strategie differenti  
per

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

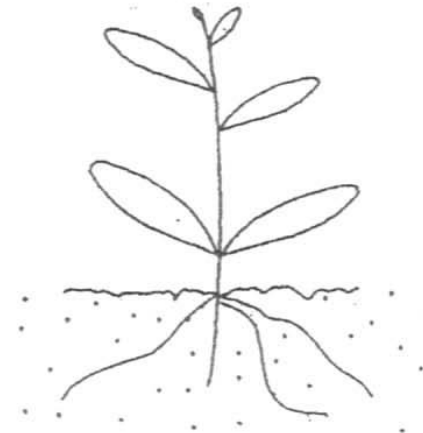
Simbiosi



In associazione



Libera



Fonte  
di energia

Carboidrati,  
Ac. organici

Essudati radicali  
dall'ospite

Residui organici  
Fotosintesi

Kg N fissato/  
ettaro/anno

50- 400

10 - 200

1- 50

## Fissazione di tipo **associativo**

I batteri diazotrofi  
in associazione  
sono **eterotrofi**

si fermano sulla  
sup radicale o  
anche nelle cell.  
epidermiche e  
corticali

- 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**:

Preferenza per acidi carbossilici C4 e malato in particolare

*6 generi di batteri diazotrofi viventi in associazione  
principalmente con graminacee*

*Hanno optimum di temp elevato (30°)*

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 ( $nmol\ C_2H_4\ per\ plant\ h^{-1}$ )	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) <sup>b</sup>
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

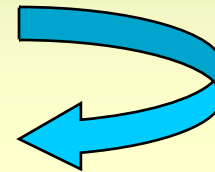
## Batteri diazotrofi liberi

• **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

Simbionti  
70%

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**

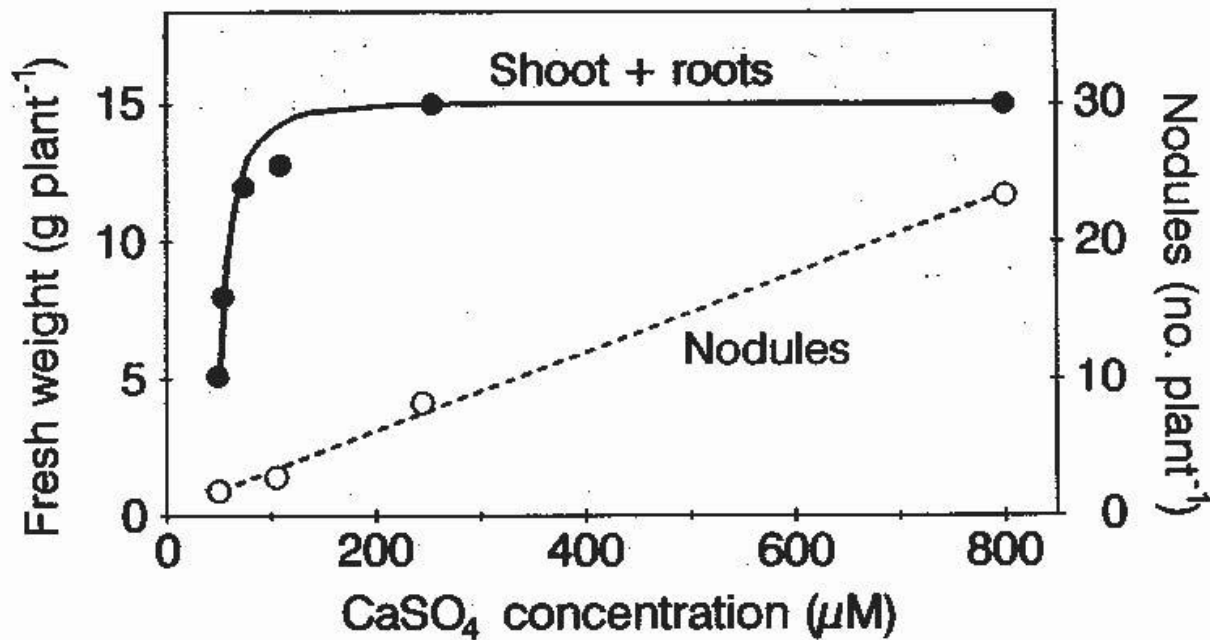
- Esempi di rapporto preferenziale tra specie di **Rhizobium** e piante ospiti.

<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  $\text{Ca}^{2+}$

- *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.

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



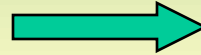
## Fasi dell' Infezione da Rhizobium

I<sup>a</sup> Tappa dell' infezione: Interazione rizobio- pianta ospite  
Colloquio molecolare

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

Molecole segnale riconosciute  
solo da specie compatibili

↓  
specificità



Colonizzazione  
*chemiotassi*



nel **batterio**:

- Attivazione geni nod
- Produzione e rilascio **fattore nod**



Degenerazione delle pareti  
cellulari dei peli radicali



Attacco dei batteri al pelo

## Il fattore Nod :

incurvamento del pelo radicale (IAA) → penetrazione filo di infezione

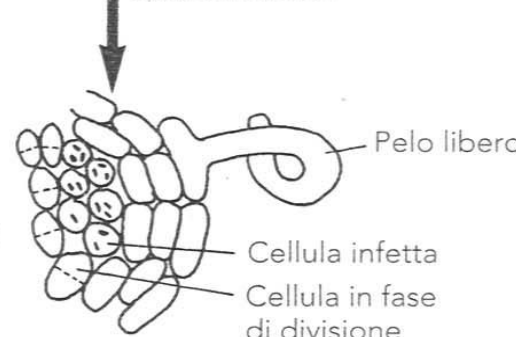
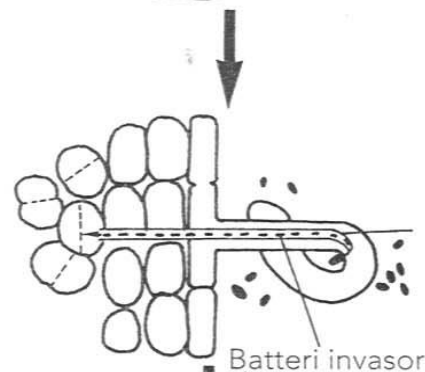
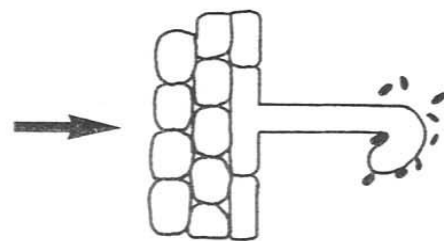
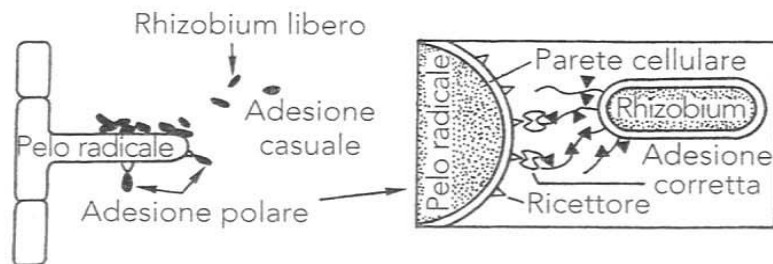
Per effetto dell'infezione le cellule corticali sono stimulate a dividersi

**Divisione cellule  
Corticali**

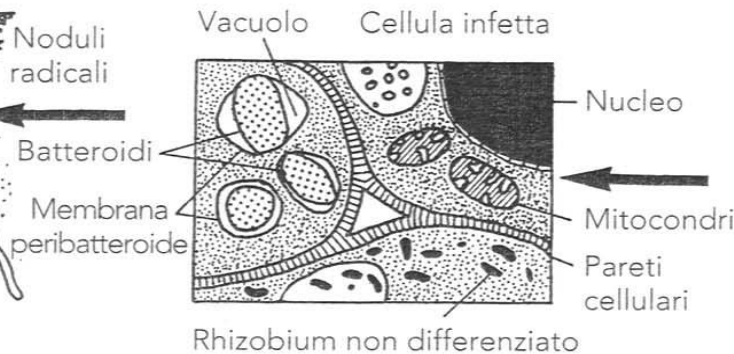
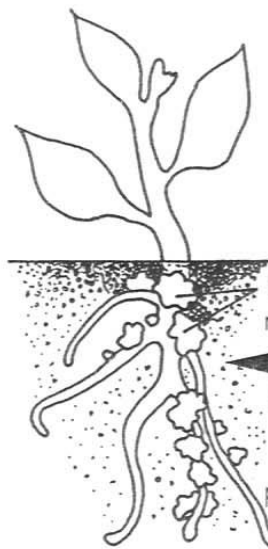
**Formazione  
meristema  
del nodulo**

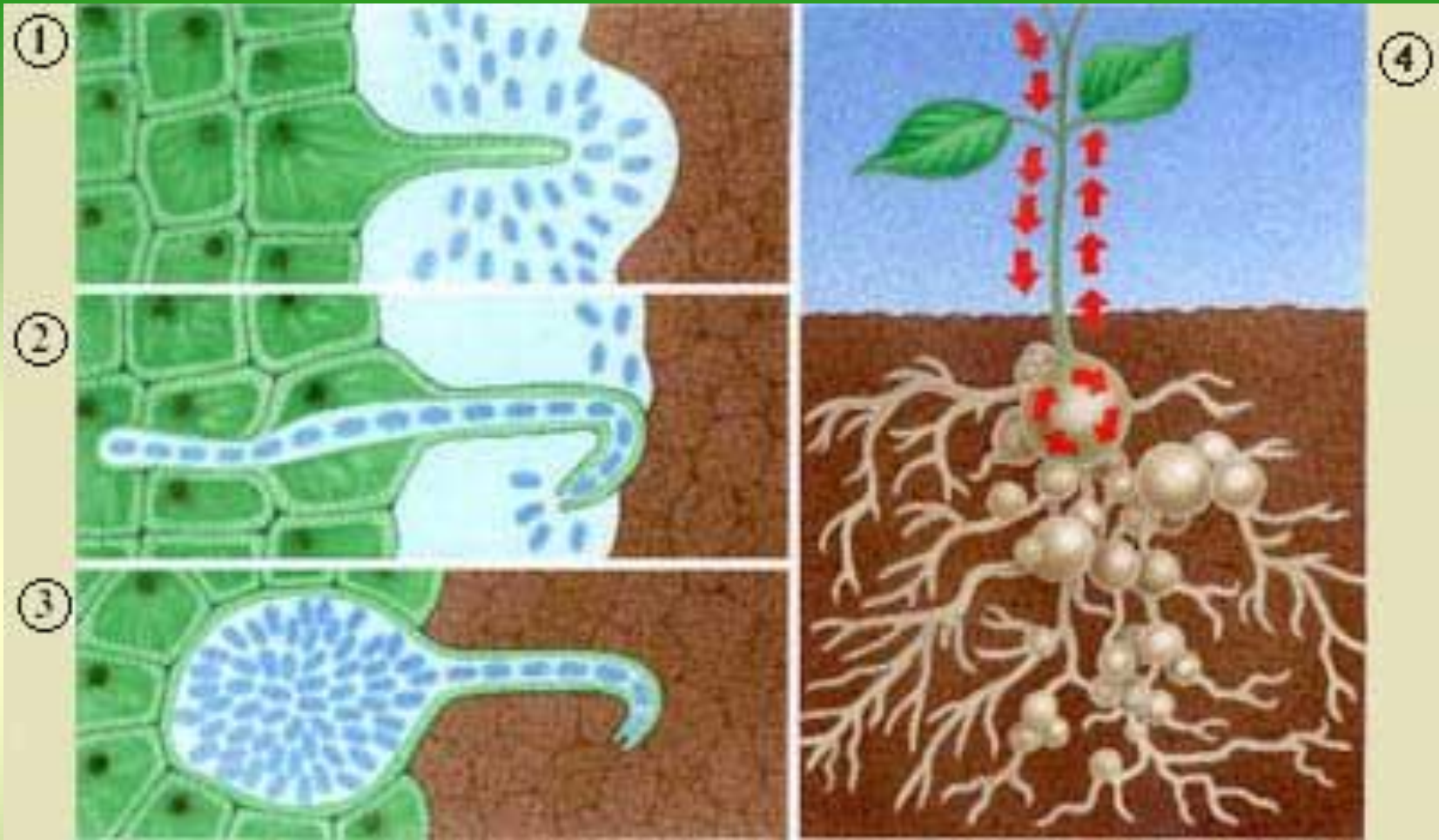
da Batteri  
a **Batteroidi**

- Sintesi di **Leg-Hb**
- **Nitrogenasi**



I batteroidi non si dividono, sono irregolari e 10 volte più grandi dei batteri





Raggiunta la concentrazione critica (15000-20000 batteri per ogni singola cellula vegetale infettata) *la pianta inibisce la formazione di nuovi noduli* .

inibizione del fattore **Nod** : *inducendo la fase di trasformazione somatica dei batteri in batteroidi e formazione dei noduli.*

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**

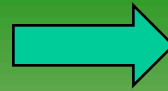
quantità di C impiegato è variabile:

**6-12 g 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 O<sub>2</sub> nei noduli**

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

**Sistema di regolazione della  $pO_2$**   
a livello cellulare



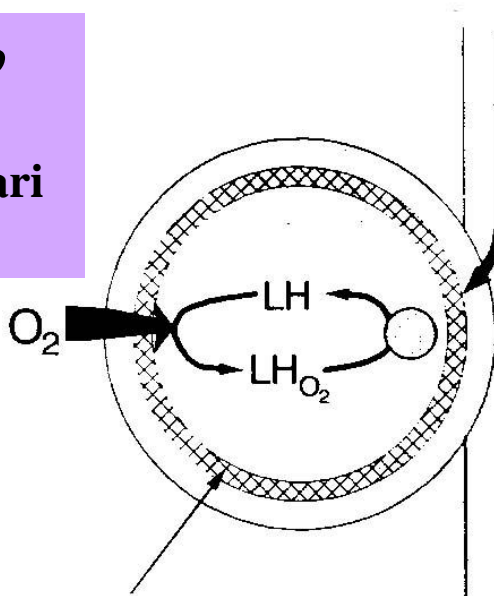
- Elevata domanda di energia (ATP)
- Inibizione della nitrogenasi

- 1) Esistenza di una barriera fisica
- 2) Leg- emoglobina :elevata affinità per l'O

**Floema (saccarosio)**

*Nodulo attivo*

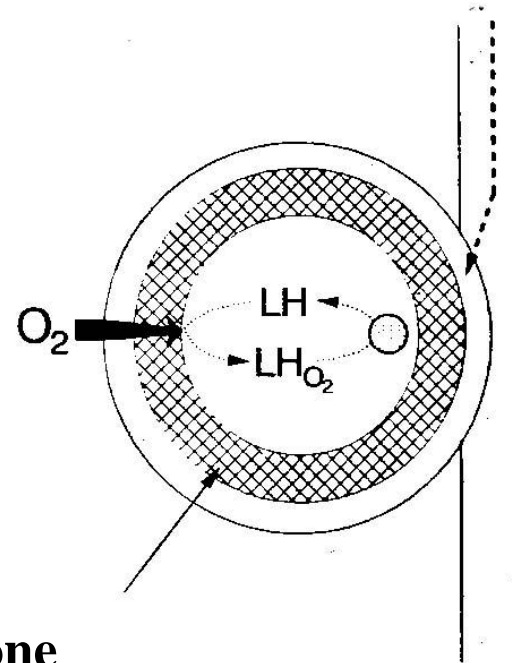
Spazi intercellulari  
con aria

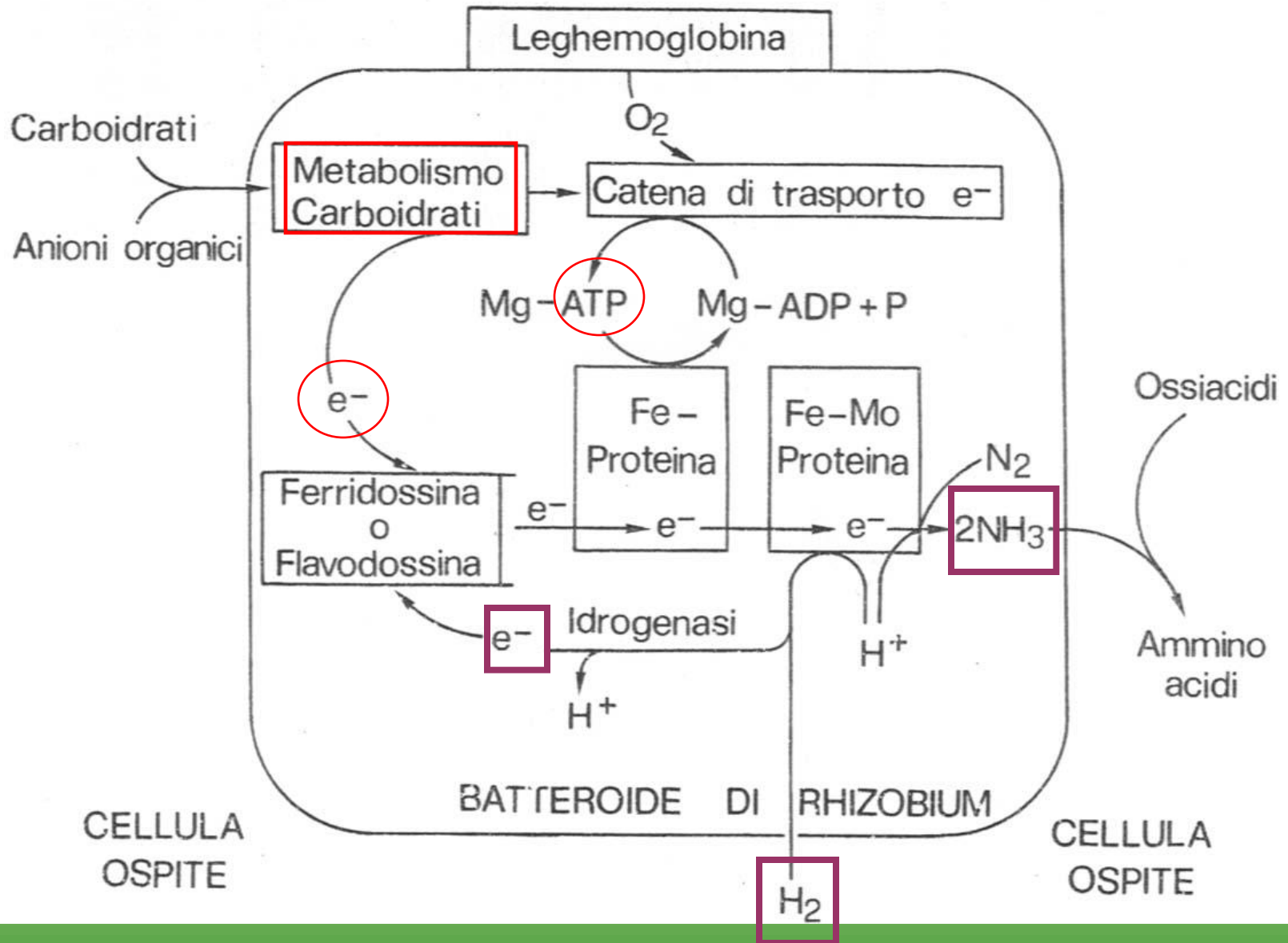


**Barriera di diffusione**

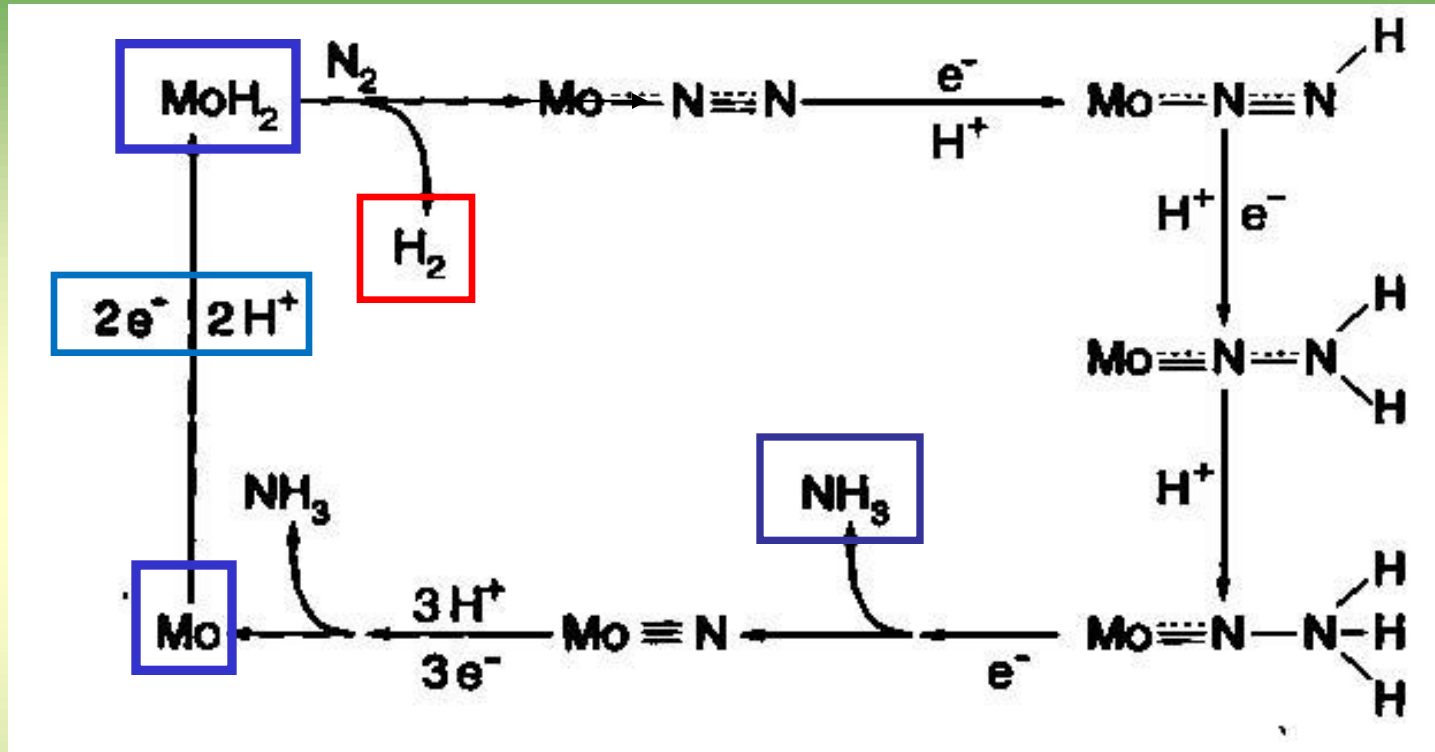
*Nodulo non  
attivo*

Spazi  
intercellulari  
con  $H_2O$





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  $H_2$

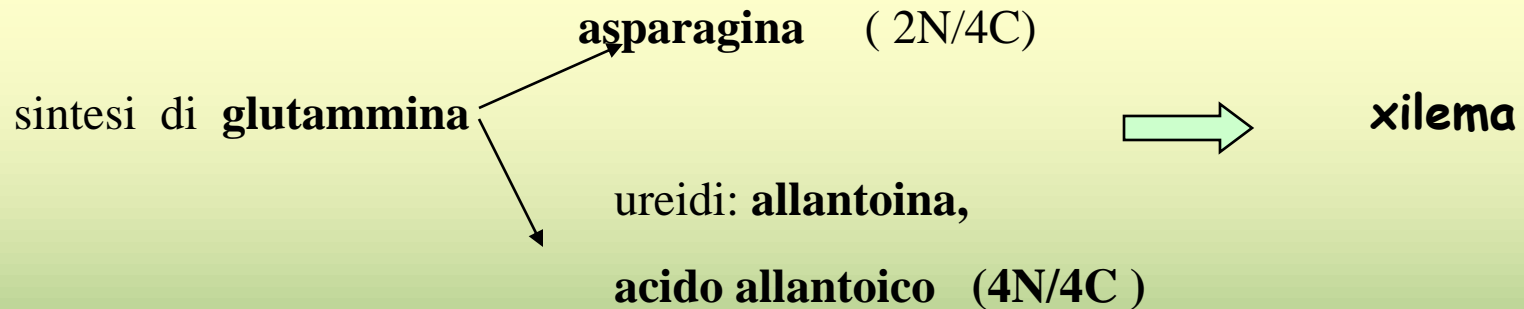
- L' N fissato è rilasciato come  $\text{NH}_3$  dal batteroide al citosol per semplice **diffusione** attraverso la membrana peribatteroide

- passaggio rapido:

elevata  $\text{NH}_3$  nel batteroide  $\longrightarrow$  inibizione della nitrogenasi

- *nel citosol:*

assimilazione dell'  $\text{NH}_3$  via GS / GOGAT





per ridurre al minimo i costi di C


















per il trasporto di N fissato



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 fertilizer supply (kg ha <sup>-1</sup> )	Nitrogenase activity (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> produced per plant h <sup>-1</sup> )		N in shoots (%) day 49	Dry weight (g per plant) day 49	
	35 days	49 days		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 

<sup>a</sup>Based on Sundstrom *et al.* (1982).

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