

# La nutrizione delle piante fra limitazioni chimiche e costrizioni fisiologiche: è possibile un'approccio sostenibile?

Zeno Varanini<sup>1\*</sup>, Stefano Cesco<sup>2</sup>, Rossella Monte<sup>2</sup>, Nicola Tomasi<sup>2</sup> e Roberto Pinton<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze, Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino, Università di Verona  
Strada Le Grazie 15, 37134 Verona

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Udine  
Via delle Scienze 208, 33100 Udine

Società Italiana di Chimica Agraria

---

## Riassunto

Le stime di crescita della popolazione mondiale e l'ampiezza dei problemi relativi a malnutrizione per mancanza di cibo o per carenza di specifici micronutrienti indicano l'importanza della nutrizione delle piante nel contesto di uno sviluppo sostenibile. A fronte di questi aspetti, che rendono indispensabile l'uso dei fertilizzanti, il tema dell'efficienza d'uso dei nutrienti nei vegetali è ben lungi dall'essere risolto: stime recenti relative alle produzioni cerealicole a livello mondiale, riportano efficienze d'uso dei fertilizzanti azotati non superiori al 35%. Questi valori risultano ancora minori per i concimi fosfatici (stime di efficienza d'uso dal 10 al 30%) con l'aggravante che, almeno con la tecnologia attuale, e sulla base di quanto fino ad ora conosciuto, si considera che le riserve di fosforo da destinare alla produzione di fertilizzanti siano sufficienti per non più di cento anni. Problemi di efficienza sono stati recentemente rilevati anche per concimi a base di chelati di metalli usati per la correzione delle carenze micronutrizionali: questi composti si sono dimostrati estremamente mobili lungo il profilo del suolo e solo in parte utilizzabili per la nutrizione vegetale. La scarsa efficienza di acquisizione dei nutrienti dal suolo, se da una parte è legata ad alcune caratteristiche intrinseche dei cicli biogeochimici dei nutrienti stessi, dall'altra appare riconducibile a limitazioni imposte da aspetti della biochimica e fisiologia dell'assorbimento nutrizionale. In questo articolo saranno illustrati e discussi alcuni esempi legati a queste problematiche relativamente ad un macro- (N) e un micro- (Fe) nutriente, con lo scopo di dimostrare come il miglioramento dell'efficienza della nutrizione minerale sia possibile solo attraverso un approccio scientifico che consideri il sistema suolo-pianta nel suo insieme. In particolare saranno considerati alcuni aspetti della fisiologia molecolare della nutrizione potenzialmente rilevanti per il miglioramento della efficienza di cattura dei nutrienti ed il ruolo di molecole organiche (sostanze umiche e fitosiderofori) la cui presenza nel suolo costituisce fattore di miglioramento delle sue potenzialità nutrizionali.

*Parole chiave:* nutrizione minerale, trasportatori ad alta affinità, interazione suolo-pianta.

## Abstract

MANCA TITOLO IN INGLESE ??

The estimate of world population growth and the extent of malnutrition problems due to lack of food or to deficit of specific micronutrients bring to light the importance of plant nutrition in the context of a sustainable development. Beside these aspects, which force to use fertilizers, the topic of nutrient use efficiency of by plants is far from being solved: recent estimates of world cereals productions indicate that use efficiency of nitrogen fertilizers is not higher than 35%. These values are even smaller for phosphorus fertilizers (estimate of use efficiency between 10 and 30%), worsen by the fact that, with the present technology and on the basis of present knowledge, it is expected that the phosphorus reserves used for fertilizer production will be sufficient for less than 100 years. Efficiency problems have also been recently raised concerning the use of synthetic chelates to alleviate deficiency of micronutrients: these compounds have been shown to be extremely mobile along soil profile and to be only partially utilizable by plants. The low uptake efficiency of nutrients from soil is, in one hand, caused by several intrinsic characteristics of the biogeochemical cycle of nutrients, by the other, seems to be limited by biochemical and physiological aspects of nutrient absorption. Only recently, the complexity of these aspects has been apprehended and it has been realized that the programs of breeding had neglected these problematic. In this review aspects related to the acquisition of a macro- (N) and a micro- (Fe) nutrient, will be discussed. The aim is to show that improvements of mineral nutrient use efficiency can be achieved only through a scientific approach, considering the whole soil-plant system. Particularly emphasis will be put on aspect of molecular physiology relevant to the improvement of nutrient capture efficiency; furthermore, the role of naturally occurring organic molecules in optimizing the nutritional capacity of soil, will be considered.

*Key-words:* mineral nutrition, high affinity carriers, soil-plant interaction.

\* Autore corrispondente: tel.: +39 045 6835623; fax: +39 045 6835623. Indirizzo e-mail: zeno.varanini@univr.it

## Introduzione

Le stime di crescita della popolazione mondiale e l'ampiezza dei problemi relativi a malnutrizione per mancanza di cibo o per carenza di specifici micronutrienti indicano l'importanza della nutrizione delle piante nel contesto di uno sviluppo sostenibile.

È previsto infatti un incremento della popolazione mondiale di ca. 4 miliardi di persone per il 2050 (Byrnes e Bumb, 1998), concentrato particolarmente nei paesi in via di sviluppo (Pinstrop-Andersen et al., 1999) che già soffrono per gravi problemi di malnutrizione. Questi dati mettono in rilievo la necessità di ottenere per gli anni futuri anche un sostanziale incremento della produzione agricola. Tale incremento non deve però solo coinvolgere aspetti quantitativi, poichè anche nelle regioni più sviluppate sono diffuse specifiche carenze nutrizionali che coinvolgono in particolare micronutrienti (Fe, Zn, I) e vitamine (vitamina A) (Welch e Graham, 2000).

Il necessario aumento di produzione dovrà essere ottenuto in gran parte utilizzando le aree agricole già disponibili, dato che l'espansione dei suoli coltivati è limitata da problematiche ambientali, urbanizzazione e diminuzione di disponibilità di risorse idriche. È stato stimato (Evenson, 1999) che la produzione globale di cibo di origine vegetale dovrebbe aumentare più del 60% per l'anno 2010, mentre si prevede che l'area destinabile alla coltivazione delle principali colture potrà aumentare solo del 10% (tab. 1).

Un ulteriore preoccupante aspetto è legato alla progressiva degradazione dei suoli dovuta

a erosione, diminuzione della disponibilità di nutrienti, scarsità d'acqua, acidificazione e salinizzazione, diminuzione del contenuto in sostanza organica e scarso drenaggio. È stato stimato che questi fenomeni insistano su quasi il 40% dei suoli coltivati (Scherr, 1999).

I nutrienti minerali svolgono un ruolo chiave nell'incremento delle produzioni, nel mantenimento della produttività del suolo e nel prevenirne la degradazione. In generale si può affermare che la fertilizzazione è stata uno dei fattori che hanno consentito negli ultimi 30 anni un raddoppiamento della produzione agricola sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli sviluppati (Loneragen, 1997).

A fronte di questi aspetti, che rendono indispensabile l'uso dei fertilizzanti, il tema dell'efficienza d'uso dei nutrienti nei vegetali è ben lungi dall'essere risolto (Baligar et al., 2001): stime recenti relative alla utilizzazione dei fertilizzanti azotati nella produzioni dei cereali a livello mondiale, riportano efficienze d'uso non superiori al 35% (Raun e Johnson, 1999). Questi valori risultano ancora minori per i concimi fosfatici (stime di efficienza d'uso dal 10 al 30%, Baligar e Bennet, 1986) con l'aggravante che, almeno con la tecnologia attuale, e sulla base di quanto fino ad ora conosciuto, si considera che le scorte siano sufficienti per non più di 100 anni (Vance, 2003).

Problematiche legate alla scarsa utilizzazione dei nutrienti apportati con le concimazioni sono stati recentemente riportate anche a riguardo di prodotti, quali i chelati di metalli usati per la correzione delle carenze micronutrizionali: questi composti infatti si sono dimostrati estremamente mobili lungo il profilo del suolo (Cesco et al., 2000) e quindi utilizzabili solo in parte per la nutrizione vegetale. Ciò implica la necessità di ripetere i trattamenti ad ogni stagione vegetativa.

In questo articolo saranno illustrati e discussi alcuni esempi legati a queste problematiche considerando un macro- (N) e un micro- (Fe) nutriente, con l'obiettivo di evidenziare come il miglioramento dell'efficienza della nutrizione minerale debba necessariamente passare attraverso un approccio scientifico che consideri il sistema suolo-pianta nel suo insieme. In particolare saranno considerati alcuni aspetti della fisiologia molecolare della nutrizione potenzialmente rilevanti per il miglioramento della effi-

Tabella 1. Stime dei tassi di incrementi di produzione e di superficie coltivata previste nel 2020 in relazione ai valori dei due parametri relativi al 1990 (Evenson, 1999).

Table 1. Estimation of the production and cultivated area growth rates expected in 2020 with regard to these parameter values in 1990 (Evenson, 1999).

Specie vegetale	Produzione	Superficie coltivata
Fruento	1.58	1.06
Mais	1.56	1.13
Riso	1.66	1.07
Altri cereali	1.48	1.09
Soia	1.77	1.14
Radici/tuberi	3.28	1.15
Media	1.89	1.11

cienza di cattura dei nutrienti ed il ruolo di molecole organiche presenti nel suolo (sostanze umiche e fitosiderofori) passibili di migliorare la capacità di quest'ultimo come mezzo nutriente.

**Il caso dell'azoto**

*Nitrato*

È noto che le radici sono in grado di assorbire dalla soluzione del suolo sia azoto ammoniacale che nitrico. A parte condizioni pedologiche particolari, la forma azotata maggiormente presente nella soluzione dei suoli agrari delle nostre latitudini è quella nitrica, con un'ordine di grandezza delle concentrazioni in soluzione nell'intervallo compreso fra 0,5 e 10 mM (Barber, 1995). I livelli di concentrazione del nitrato sono soggetti a rapide fluttuazioni, che possono anche raggiungere i tre o quattro ordini di grandezza, e sono causati da fattori biotici (assorbimento da parte degli apparati radicali, nitrificazione e denitrificazione microbica), abiotici (dilavamento ad opera di acque percolanti) e, nei terreni agrari, soprattutto antropici (somministrazione di fertilizzanti azotati). Lo ione nitrato è scarsamente trattenuto dalla fase solida del terreno, si muove prevalentemente per flusso di

massa ed è soggetto a forte dilavamento.

Data l'importanza del nitrato sia come nutriente, sia come segnale per la crescita –costituisce infatti un fattore di regolazione del metabolismo del carbonio e dell'azoto, dei livelli di fitormoni, e della morfologia della pianta – appare evidente che per far fronte alle fluttuazioni della sua disponibilità che si verificano nel terreno, le piante hanno dovuto evolvere dei sistemi di assorbimento flessibili e dalla sofisticata regolazione.

L'assorbimento del nitrato, al contrario di quello che si verifica per altri nutrienti ossia anionici (ad es. solfato e fosfato), è un fenomeno inducibile dalla presenza dell'anione (fig. 1 – parte A).

La piena capacità di trasporto può essere raggiunta solo dopo alcune ore o giorni di contatto tra l'apparato radicale e lo ione: il periodo di tempo necessario dipende dalla concentrazione di nitrato e dalla specie o dalla cultivar considerata (Locci et al., 2001).

Quando l'accumulo di nitrato interno supera le necessità metaboliche del vegetale, si osserva una diminuzione della velocità di influsso del nitrato (retro-regolazione; fig. 1 – parte B). D'altra parte il fenomeno dell'induzione è ripetibile (fig. 1 – parte C), purchè il contatto delle radici con l'anione sia preceduto da un periodo di bassa disponibilità di nitrato tale da diminuire i pool azotati interni.

La complessità del processo di assorbimento del nitrato si manifesta anche dallo studio delle caratteristiche cinetiche dei sistemi di trasporto. Infatti essi manifestano andamenti non descrivibili semplicemente da un'unica curva a saturazione. A concentrazioni di nitrato inferiori a 0.25-0.5 mM, si osserva un andamento con cinetiche saturabili, mediate da sistemi di trasporto sia costitutivi, sia substrato-inducibili. Questi mostrano un'alta affinità nei confronti del nitrato e vengono classificati come HATS (high-affinity transport systems).

Il trasportatore costitutivo ad alta affinità (CHATS – constitutive high-affinity transport system) è caratterizzato da una bassa capacità di trasporto, ed una saturazione a basse concentrazioni di substrato. Esso comunque riveste una fondamentale importanza fisiologica, poiché media un flusso di nitrato all'interno della cellula che permette l'induzione del sistema di trasporto ad alta affinità (IHATS – inducible hi-

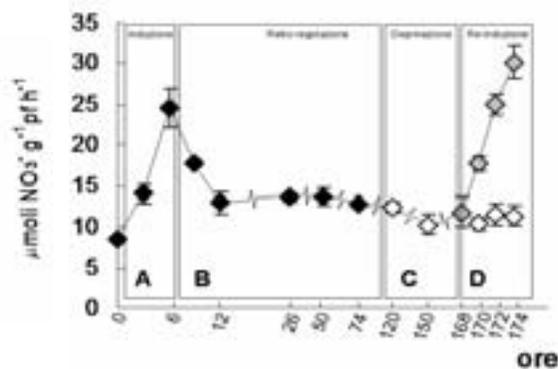


Figura 1. Andamento nel tempo della velocità di assorbimento netto di nitrato alla concentrazione di 200µM in piante esposte a fluttuazioni delle disponibilità dell'anione. (Induzione e Retro-regolazione: radici delle piante esposte a 1mM nitrato; Deprivazione: assenza di azoto; Re-Induzione: piante esposte a 1mM nitrato).

Figure 1. Time trend of nitrate net absorption rate at 200µM concentration in plants exposed to fluctuation of anion availability. (Induction and Retro-regulation: plant roots exposed to 1mM nitrate; Deprivation: lack of N; Re-Induction: plants exposed to 1mM nitrate).

Tabella 2. Parametri cinetici dei sistemi di trasporto del nitrato e intervallo di concentrazione dell'anione nella soluzione del suolo.

Table 2. Kinetic parameters of nitrate transfer systems and concentration range of the anion in the soil solution.

Meccanismi di trasporto	Km μM	Vmax μmol g <sup>-1</sup> pf h <sup>-1</sup>
CHATS	6-20	0.3-0.82
IHATS	20-100	3-8
LATS	Cinetica lineare	
Concentrazioni di nitrato nella soluzione del terreno	μM 500-10000	

gh-affinity transport system) e capacità. A quest'ultimo è attribuito il maggiore contributo allo sviluppo della capacità di assorbimento del nitrato successivo al contatto fra apparato radicale e anione.

A concentrazioni superiori a 0.25-0.5 mM (e fino a 50 mM), la cinetica di assorbimento risulta non saturabile. L'assorbimento in questo caso è mediato da un sistema di trasporto costitutivo, a bassa affinità per il substrato, definito LATS (low-affinity transport system).

Da un punto di vista agronomico può risultare interessante confrontare i parametri cinetici dei sistemi di trasporto (tab. 2) con le concentrazioni medie di nitrato osservate nei suoli, allo scopo di valutare il contributo relativo di ciascun componente nelle condizioni di campo.

Sulla base dei modelli relativi al movimento del nitrato nel suolo, è stato calcolato che una concentrazione di 0.3-0.4 mM di questo nutriente in soluzione dovrebbe essere sufficiente a mantenere saturati i sistemi ad alta affinità e in una condizione di retro-regolazione (Vidmar et al., 2000). Ciò implicherebbe che in tali condizioni il contributo di questo sistema di trasporto del nitrato è limitato. D'altra parte è ben noto che i cereali ed altre piante coltivate rispondono alla somministrazione di fertilizzanti azotati, anche quando il loro apporto è tale da determinare una concentrazione di nitrato molto elevata.

Il clonaggio e l'identificazione di geni che codificano per i trasportatori del nitrato hanno permesso di identificare due diverse famiglie multigeniche (*NRT1* e *NRT2*) che non mostrano omologie nelle loro sequenze (Forde, 2000). In generale è possibile affermare che prodotti dei geni *NRT1* costituiscono i trasportatori a bassa affinità (LATS), mentre quelli dei geni

*NRT2* mediano il trasporto ad alta affinità (HATS). Studi recenti hanno mostrato la presenza nei vegetali di una pluralità di geni codificanti per trasportatori del nitrato: ad es. in *Arabidopsis* quattro geni *NRT1* e sette geni *NRT2*. D'altra parte di questi solo un esiguo numero appare implicato nelle relazioni rizosfera-radice (Varanini e Pinton, 2007). È ragionevole pensare che gli altri prodotti genici svolgano ruoli diversi nella distribuzione del nitrato nei diversi organi della pianta e nelle diverse fasi fenologiche (Okamoto et al., 2003; Chopin et al., 2007). Queste informazioni risultano di grande interesse perchè mostrano che i tentativi di migliorare l'efficienza di acquisizione del nitrato a livello di interfaccia rizosfera-radice devono tener conto dello specifico ruolo e delle peculiari caratteristiche di regolazione dei geni, e dei loro prodotti effettivamente coinvolti nel fenomeno.

#### Ammonio

Le radici sono in grado di assorbire non solo l'azoto nitrico ma anche quello ammoniacale. L'ammonio è presente nella soluzione del suolo a concentrazioni da 10 a 1000 volte inferiori rispetto a quelle del nitrato, raggiungendo valori millimolari solo in momenti particolari del ciclo produttivo quali quelli seguenti alle concimazioni (Marschner, 1995). Anche se per questi motivi l'azoto nitrico è stato considerato come la maggiore fonte di azoto minerale per la nutrizione, è ragionevole pensare che l'importanza dell'ammonio per la crescita delle colture sia stata sottostimata. Infatti, la concentrazione di questo nutriente nella soluzione del suolo rappresenta, mediamente, solo il 10% dell'ammonio trattenuto sul complesso di scambio e a seguito dell'assorbimento da parte degli apparati radicali, questa riserva può essere rilasciata per mantenere costante la concentrazione del nutriente in soluzione. Inoltre è stato osservato (vedi oltre) che le velocità di assorbimento misurate per l'ammonio sono superiori o perlomeno simili a quelle del nitrato ed è noto che in presenza di ammonio si ha una inibizione dell'assorbimento di nitrato (Forde e Clarkson, 1999).

I vegetali possiedono sistemi costitutivi in grado di assorbire ammonio con velocità di assorbimento, a parità di concentrazione esterna, in genere superiori rispetto a quelle manifestate dai vegetali per il nitrato (tab. 3).

Tabella 3. Confronto della velocità di assorbimento del nitrato o ammonio in piante trattate nelle seguenti condizioni: 3 ore con 0.5 mM nitrato (fase di massima induzione); 24 ore con 0.5 mM nitrato (fase di retroregolazione), 7 giorni deprivate dell'ammonio (fase di derepressione), allevamento in soluzione nutritiva con apporto continuo di ammonio 0.5 mM (fase di repressione). La soluzione in cui veniva misurata la velocità di assorbimento era rispettivamente nitrato o ammonio 0.1 mM.

Table 3. Comparison of nitrate or ammonium absorption rate in plants treated in the following conditions: 3 hours by 0,5 mM nitrate (maximum induction phase); 24 hours by 0,5 mM nitrate (retro-regulation phase), 7 days lacking of ammonium (derepression phase), grown in a nutritive solution with a continuous input of ammonium 0,5 mM (repression phase). The solution where the absorption rate was measured was nitrate or ammonium 0,1 mM, respectively.

Velocità di assorbimento del nitrato ( $\mu\text{molNO}_3\text{g}^{-1}\text{pfr h}^{-1}$ )	Velocità di assorbimento dell'ammonio ( $\mu\text{molNH}_4\text{g}^{-1}\text{pfr h}^{-1}$ )
Fase di massima induzione 22.3	Fase di deprivazione (derepressione) 30.8
Fase di retroregolazione 7.9	Fase di somministrazione (repressione) 13.9

Questi sistemi, in piante affamate di azoto, vengono sovra-regolati, ma la loro velocità ritorna al livello iniziale poche ore dopo l'aggiunta di ammonio (Glass et al., 2002). Anche per il trasporto dell'ammonio è stata evidenziata la presenza di due sistemi di trasporto: un sistema saturabile ad alta affinità (HATS), attivo a basse concentrazioni di ammonio, ed uno lineare a bassa affinità (LATS). Quest'ultimo, che fornisce un contributo rilevante al trasporto a concentrazioni esterne di ammonio superiori a 1 mM, si presume coinvolga l'attività di canali in grado di trasportare anche potassio (White, 1996). Il funzionamento del sistema LATS non sembra essere influenzato dalla concentrazione interna di composti azotati (Glass et al., 1997; Rawat et al., 1999). Il sistema HATS che appare il maggior responsabile delle variazioni di velocità d'assorbimento determinate dalle fluttuazioni della concentrazione di azoto alla rizosfera, è represso in condizioni di adeguato rifornimento di azoto. In condizioni di limitata disponibilità di ammonio la capacità delle radici di assorbire il catione attraverso il sistema HATS cresce notevolmente (fig. 2).

Il trasporto dell'ammonio è quindi indotto dalla sua carenza e retroregolato dal suo accumulo o dall'accumulo di prodotti della sua assimilazione.

Numerosi trasportatori ad alta affinità per l'ammonio appartenenti alla sottofamiglia AMT sono stati clonati in diverse specie vegetali (Loqué e von Wiren, 2004). In *Arabidopsis* sono stati individuati 6 geni AMT; di questi, due (AMT1:1 e AMT1:3) risultano svolgere un ruolo nell'assorbimento dell'ammonio a livello del-

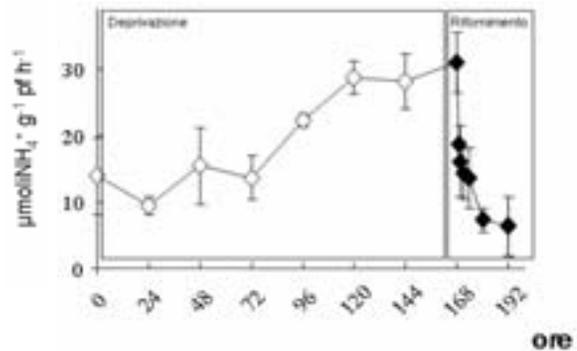


Figura 2. Andamento nel tempo della velocità di assorbimento netto di ammonio alla concentrazione di 100 $\mu\text{M}$  in piante esposte a fluttuazioni delle disponibilità del catione. (Deprivazione: assenza di azoto; Rifornimento: piante esposte a 0,5mM ammonio).

Figure 2. Time trend of ammonium net absorption rate at 100 $\mu\text{M}$  concentration in plants exposed to fluctuation of cation availability. (Deprivation: lack of N; Supply: plants exposed to 0,5mM ammonium).

la radice. Un problema ancora aperto riguarda il meccanismo con cui l'ammonio è trasportato dai prodotti dei geni AMT. Infatti, benchè i dati relativi alle concentrazioni rizosferiche e citosoliche suggeriscano la necessità di un simporto ammonio/protoni per l'energizzazione del trasporto, convincenti risultati ottenuti facendo esprimere un trasportatore di ammonio di pomodoro (*LeAMT1:1*) in oociti di *Xenopus* (Ludewig et al., 2002) sono a favore di un processo di uniporto dipendente dal potenziale elettrico e dal gradiente di concentrazione del catione transmembrana. Il funzionamento di questo meccanismo, che pure mostra una  $K_m$  (10  $\mu\text{M}$ ) simile a quella osservata in radici intatte

di pomodoro, pone quindi il problema di riconsiderare le concentrazioni citosoliche e rizosferiche di ammonio finora stimate da diversi autori (Forde e Clarkson 1999).

#### *Energetica del trasporto di nitrato e ammonio*

Studi recenti condotti sia a livello fisiologico che molecolare hanno dimostrato che alle concentrazioni usualmente riscontrate nei terreni agrari sia l'assorbimento del nitrato che quello dell'ammonio richiedono energia metabolica (Glass et al., 1997; Crawford e Glass, 1998).

Per quanto riguarda il nitrato, il suo ingresso all'interno della cellula avviene sia contro gradiente elettrico che contro gradiente chimico. È quindi necessaria una fonte di energia per il suo trasporto attraverso la membrana plasmatica; numerose prove indicano che il processo di assorbimento avviene tramite un meccanismo elettrogenico di cotrasporto con protoni (Ullrich e Novacky, 1981; Tsay et al., 1993). Più recentemente è stato messo in luce che nel fenomeno è coinvolta l'attività della pompa protonica del plasmalemma (PM H<sup>+</sup>-ATPasi). Questo enzima, codificato da famiglie multigeniche, agisce come trasportatore primario estrudendo protoni all'esterno della cellula a spese dell'ATP citoplasmatico e determinando la creazione di un gradiente elettrochimico di protoni transmembrana che può essere sfruttato per il trasporto secondario di nutrienti e metaboliti. È stato osservato che esiste un parallelismo fra induzione e retroregolazione dell'assorbimento del nitrato e attività e quantità della PM H<sup>+</sup>-ATPasi delle cellule radicali (Santi et al., 1995, Santi et al., 2003). In questi cambiamenti appaiono coinvolte solo specifiche isoforme di PM H<sup>+</sup>-ATPasi suggerendo la possibilità di una "specializzazione nutrizionale" per forme isoenzimatiche di questa proteina.

L'assorbimento dell'ammonio, per concentrazioni del catione alla rizosfera nell'ordine delle micromoli, risulta essere un meccanismo attivo che causa una depolarizzazione del potenziale di membrana (Ullrich et al., 1984; Wang et al., 1994) e avviene contro gradiente di concentrazione. D'altra parte, come sopra già accennato, la concentrazione citoplasmatica dell'ammonio non è stata fino ad ora determinata con precisione in quanto mancano tuttora delle tecniche specifiche che consentono di effettuare misure affidabili. Alcuni autori ritengono ra-

gionevoli concentrazioni cellulari di ammonio variabili da 1 a 40 mM (Lee e Ratcliffe, 1991; Wang et al., 1993a). I dettagli del meccanismo di accoppiamento energetico nel trasporto del catione sono sconosciuti: nel trasporto attivo via HATS sono stati ipotizzati meccanismi che includono un simporto protonico oppure la presenza di una ATPasi che specificamente trasporti ammonio, ma le prove molecolari finora più convincenti sono a favore di un sistema di uniporto (vedi sopra). Per concentrazioni di ammonio maggiori di 0.5-1.0 mM, il trasporto avviene in modo lineare attraverso il sistema LATS. Il meccanismo coinvolto appare essere in questo caso un uniporto guidato da gradiente elettrico e solo in questo senso dipendente da energia metabolica (Wang et al., 1993b, Kronzucker et al., 1996).

#### *Efflusso*

Numerose evidenze sperimentali hanno messo in rilievo la presenza negli apparati radicali di una componente di efflusso che riguarda sia il nitrato che l'ammonio. Per quanto riguarda il primo l'efflusso presenta caratteristiche substrato-inducibili; tuttavia le caratteristiche della sua regolazione (Aslam et al., 1996), differenti da quelle dell'influsso, suggeriscono il coinvolgimento di strutture molecolari diverse dai trasportatori che mediano l'assorbimento del nutriente. L'entità dell'efflusso di nitrato è molto variabile in funzione della specie e delle condizioni di allevamento. Il fenomeno si manifesta con più evidenza in condizioni di elevata concentrazione citoplasmatica e rizosferica del nutriente. In queste situazioni sono stati misurati valori di efflusso pari anche al 30% dell'influsso (Siddiqi et al., 1991). È stato ipotizzato che l'efflusso di nitrato sia mediato da canali anionici la funzione dei quali potrebbe essere quella di regolare la concentrazione citoplasmatica del nitrato stesso o di controllare la concentrazione di anioni come il cloro in condizioni saline.

Anche per l'ammonio esiste un'importante componente di efflusso che appare correlata alla concentrazione citoplasmatica dell'ammonio stesso. L'entità dell'efflusso aumenta con l'aumentare dell'influsso che a sua volta risente delle variazioni di concentrazione esterna del catione (Wang et al., 1993a). Informazioni sulle basi molecolari di questo fenomeno, interpretato da alcuni autori come meccanismo atto ad

evitare concentrazioni citosoliche troppo elevate di ammonio, non sono presenti in letteratura.

#### *Aspetti complessivi della regolazione dell'assorbimento dell'azoto nel sistema-suolo pianta*

Come riportato in dettaglio nei paragrafi precedenti, l'influsso di nitrato e ammonio, mediato dai sistemi IHATS e HATS rispettivamente, può essere rapidamente retroregolato. È stato dimostrato che questo fenomeno è legato all'accumulo di glutammina (Vidmar et al., 2000) – primo metabolita della via assimilativa dell'azoto – che esercita un'azione di repressione sull'espressione dei geni *NRT2* e *AMT*. La rapida retroregolazione dei sistemi HATS per l'assorbimento di nitrato e ammonio pone la questione dell'importanza relativa di questi sistemi nei suoli coltivati dove le concentrazioni di nitrato e ammonio possono raggiungere valori considerevoli: in queste situazioni è ragionevole pensare che il contributo di questi sistemi di trasporto sia trascurabile e che l'assorbimento avvenga attraverso i meno efficienti sistemi LATS come già anticipato nei paragrafi precedenti relativamente al ruolo dei sistemi di trasporto del nitrato.

Nel momento in cui ci si voglia riferire al sistema suolo-pianta coltivata, un'ulteriore complicazione è data dal fatto che nitrato e ammonio sono presenti contemporaneamente nella soluzione del suolo. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che la presenza di ammonio nella soluzione di assorbimento causa, nel giro di pochi minuti, una diminuzione della velocità di assorbimento del nitrato (Lee e Drew, 1989). Le basi molecolari di questo effetto non sono conosciute. L'effetto dell'ammonio sull'assorbimento del nitrato risulta ancora più pronunciato per tempi di contatto lunghi: in queste condizioni la rapida conversione di ammonio in glutammina determina il già descritto fenomeno di repressione dei geni *NRT2*. Esperimenti condotti con piante allevate in soluzione idroponica hanno mostrato che, generalmente, quando le piante sono poste ad assorbire nitrato e ammonio da miscele che li contengano contemporaneamente, il nitrato non viene assorbito finché non è stato consumato tutto l'ammonio disponibile (Guerrero et al., 1981). È d'altra parte importante ricordare che questi risultati non possono essere semplicisticamente trasposti al sistema suolo-pianta dato che nel suolo le inte-

razioni dei due nutrienti con la fase solida le loro dinamiche di movimento verso la radice e i rapporti di concentrazione in soluzione sono completamente diversi rispetto a quanto avviene in soluzione idroponica.

Anche i parametri climatici possono condizionare l'efficienza di acquisizione dell'azoto. La velocità di assorbimento di nitrato e ammonio varia infatti notevolmente durante il ciclo giornaliero (Tischner, 2000) e risulta ridotta in condizioni di bassa irradianza (Clement, 1978). Ciò implica che nelle condizioni reali il periodo di massimo assorbimento è limitato a ben precisi momenti e che le riduzioni di irradianza dovute ad eventi meteorologici possono costituire una ulteriore limitazione della capacità di acquisire il nutriente. Oltre a ciò è stato anche rilevato che il livello di sensibilità alle variazioni di temperatura dei sistemi ad alta affinità è maggiore di quello dei sistemi a bassa affinità (valori di  $Q_{10}$  di 3,9 e 1,7 rispettivamente nell'intervallo di temperatura compreso fra 5 a 10 °C), questo fatto rappresenta un ulteriore svantaggio perché limita l'efficienza di cattura dei nutrienti alle basse temperature.

### **Il caso del ferro**

#### *Il ferro nel suolo: strategie di acquisizione dei vegetali*

Il Fe, micronutriente essenziale, è generalmente presente nei terreni ben aereati in quantità totali elevate, ma in forme scarsamente disponibile per le piante. La solubilità dello ione ferro è infatti molto bassa ( $10^{-18.4}$  M a pH 7,0) e si riduce all'aumentare del pH (1000 volte per ogni unità di pH). Le specie vegetali hanno evoluto due diverse strategie di risposta alla limitata disponibilità del micronutriente (Marschner et al., 1986) che consistono nell'amplificazione di meccanismi normalmente utilizzati per l'acquisizione del nutriente (fig. 3).

Le dicotiledoni e le monocotiledoni non graminacee (piante a Strategia I) sono in grado di aumentare considerevolmente l'attività e la quantità di enzimi associati alla membrana plasmatica, quali la  $Fe^{III}$ -chelato riduttasi e la PM  $H^+$ -ATPasi; il fenomeno è accompagnato da variazione dei livelli dei trascritti del gene *FRO1* ( $Fe^{III}$ -chelato riduttasi) (Robinson et al., 1999), di specifiche isoforme della PM  $H^+$ -ATPasi

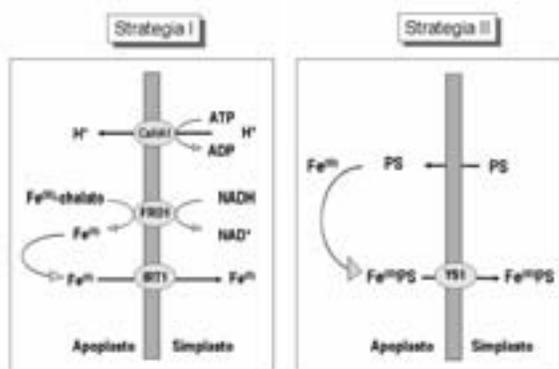


Figura 3. Rappresentazione schematica delle strategie di risposta alla limitata disponibilità del micronutriente da parte delle piante dicotiledoni e monocotiledoni non graminacee (Strategia I) e delle monocotiledoni (Strategia II).

Figure 3. Schematic description of answer strategies to limited availability of the micronutrient in dicotyledonous and monocotyledonous not graminaceous plants (Strategy I) and monocotyledon (Strategy II).

(Santi et al., 2005) e del trasportatore del  $Fe^{2+}$  *IRT1* (Curié e Briat, 2003). Le graminacee (piante a Strategia II), in condizioni di limitata disponibilità di Fe, possono aumentare la sintesi ed il rilascio alla rizosfera di composti organici a basso peso molecolare detti fitosiderofori (PS) in grado di formare complessi stabili con il  $Fe^{3+}$  presente nel suolo; questa strategia coinvolge anche l'attivazione di un trasportatore specifico per il complesso Fe-PS, codificato dal gene *YSI* (Curié et al., 2001), che media il passaggio del nutriente attraverso la membrana plasmatica. Diversamente dalle piante a Strategia I, la risposta alla carenza di Fe nelle graminacee risulta molto meno influenzata da valori elevati di pH del suolo quali quelli che si possono verificare nei terreni calcarei. È tuttavia da ricordare che la capacità di rispondere alla carenza di Fe è fortemente variabile tra specie e specie e, all'interno di ciascuna specie, tra cultivar diverse.

#### Soluzioni sostenibili al problema della Fe-carenza

a) *Consociazione fra piante a strategia I e strategia II.* La limitata disponibilità di Fe nel terreno è una problematica particolarmente avvertita negli impianti arborei delle specie da frutto dove si manifesta con la comparsa di clorosi fogliare. Questa fisiopatia comporta una drastica limitazione della produttività, peggioramento qualitativo del frutto, calo del vigore vegetativo

della pianta e accorciamento del periodo produttivo dell'impianto (Tagliavini e Rombolà, 2001).

Attualmente, negli arboreti, gli effetti della carenza di Fe vengono controllati principalmente mediante la distribuzione al suolo o l'applicazione alla chioma di complessi o chelati di Fe (Tagliavini e Rombolà, 2001). Questi trattamenti, tuttavia, presentano un costo elevato e consentono un re-inverdimento dell'apparato fogliare di breve durata. La bassa stabilità che caratterizza alcuni di questi complessi (citrato, gluconato, lignosulfonato) o chelati sintetici (HEDTA, EDTA, DTPA) con il Fe, li rende inadatti a mantenere il Fe in soluzione (Lucena, 2003). D'altra parte, l'impiego di chelati sintetici del Fe particolarmente stabili quali ad esempio Fe-EDDHA, Fe-EDDHMA, può presentare rischi ambientali derivanti dalla loro elevata mobilità lungo il profilo del suolo (Cesco et al., 2000). A ciò si aggiunge il limitato utilizzo da parte delle piante di questi composti distribuiti al suolo quando applicati troppo presto in primavera, quando le temperature del suolo sono troppo basse, o quando l'acquisizione dei nutrienti da parte delle radici è compromessa da fenomeni di eccesso d'acqua. Da quanto sopra descritto appare quindi evidente che l'utilizzo di chelati/complessi sintetici del Fe, anche se efficienti quando distribuiti seguendo appropriati accorgimenti, non rappresenta un approccio sostenibile alla prevenzione o cura della carenza di Fe negli arboreti; anzi, i limiti di tale pratica agronomica rende ancor più evidente la necessità di sviluppare strategie, alternative a quelle oggi disponibili, di cura e controllo della clorosi ferrica che siano allo stesso tempo economicamente sostenibili, durature nel tempo e a basso impatto ambientale.

Recentemente utilizzando piante di actinidia allevate in un terreno clorosante è stato dimostrato che la consociazione con graminacee da inerbimento (*Lolium perenne* L., *Poa pratense* L., *Festuca rubra* L.) esercita un effetto positivo nell'alleviare i sintomi da Fe-carenza nella pianta arborea (Rombolà et al., 2003), suggerendo l'esistenza di possibili mutue interazioni tra le due specie. Risultati ottenuti da esperimenti che prevedevano l'impiego in soluzione idroponica di idrossido di Fe marcato ( $^{59}Fe(OH)_3$ ) quale fonte ferrica, hanno dimostrato che portainnesti di citrus sono in grado

di avvantaggiarsi della presenza nel mezzo di PS rilasciati da *P.pratensis* e *Erubra*, acquisendo una più elevata quantità di  $^{59}\text{Fe}$  (Cesco et al., 2005); analisi dei contenuti di Fe in lisciviati di rizobox contenenti terreno calcareo e sui quali erano stati allevati portainnesti di citrus consociati con graminacee da inerbimento hanno evidenziato che tale effetto è riconducibile all'aumentata quantità di Fe in soluzione come conseguenza della presenza nel mezzo di PS e della loro elevata capacità di mobilizzare Fe da fonti scarsamente solubili (Cesco et al., 2006a). Questo comportamento dà luogo alla formazione alla rizosfera delle due specie vegetali di complessi  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PS}$  che possono non solo essere assorbiti dalla graminacea ma anche costituire substrato per la  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -chelato riduttasi del plasmalemma radicale delle piante a Strategia I (fig. 4).

I risultati di questi lavori supportano l'ipotesi che la consociazione delle piante arboree da frutto con graminacee possa rappresentare un approccio promettente per prevenire e curare la carenza di Fe e i suoi sintomi negli arboreti.

La co-coltivazione di piante a Strategia I e II non è una pratica agronomica esclusivamente applicabile a graminacee da inerbimento e specie arboree da frutto, ma con opportuni accorgimenti può essere estesa anche alla coltivazione in pieno campo di specie annuali. Un

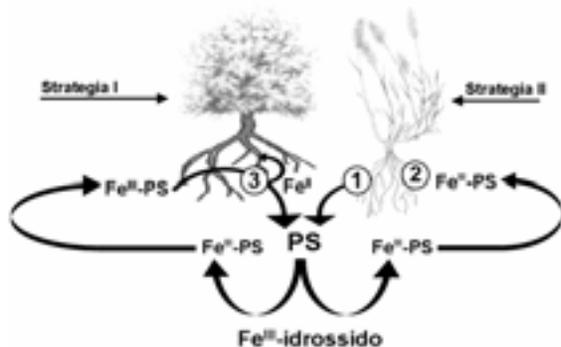


Figura 4. Ruolo dei PS nel processo di acquisizione del Fe in piante a Strategia I e II consociate. (1: sistema di rilascio di PS; 2: sistema specifico di trasporto del Fe-PS; 3:  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -chelato riduttasi della membrana plasmatica). Modificato da Cesco e Rombolà, 2006.

Figure 4. Role of PS in Fe absorption process in intercropped Strategy I and II plants. (1: PS release system; 2: Fe-PS transport specific system; 3: plasmatic membrane  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -chelate reductase). Modified from Cesco and Rombolà, 2006).

esempio è l'esperienza di coltivazione di piante di arachide (*Arachis hypogaea* L.), specie a strategia I molto sensibile alla limitata disponibilità di Fe, intercalate con file di mais (*Zea mays* L.), considerata specie a strategia II Fe-efficiente (Zuo et al., 2000). Solo quando le piante di mais erano coltivate in file intercalate con piante di arachide, in queste ultime non comparivano i sintomi di Fe-carezza; esperimenti condotti sia in campo sia in rizobox hanno rivelato che il fenomeno era rilevabile solamente quando avveniva il contatto tra gli apparati radicali delle due specie coltivate.

b) *Azione di Fe-umati*. Nell'interazione suolo-pianta, un ruolo importante è giocato dalla presenza di molecole organiche capaci di modificare la crescita e la nutrizione delle piante. In particolare è stato variamente dimostrato che frazioni della sostanza organica del suolo possono influenzare il metabolismo della pianta interagendo con una serie di meccanismi biochimici e processi fisiologici e causando di conseguenza modificazioni morfologiche ed aumento dell'assorbimento ed accumulo di nutrienti.

Le sostanze umiche (SU), che rappresentano circa il 60% della sostanza organica del suolo, sono il risultato di trasformazioni chimiche e biologiche di residui vegetali, animali e microbici operato dai microrganismi del suolo. I composti che ne risultano sono più stabili dei loro precursori, hanno caratteristiche strutturali complesse e massa molecolare che varia da poche centinaia a centinaia di migliaia di Da. È stato proposto che gli effetti stimolatori sulla crescita e nutrizione delle piante non siano solo legati alla capacità delle SU di fungere da fonte di nutrienti e composti chelanti, ma anche all'interazione con meccanismi di trasporto ionico situati sulla membrana plasmatica di cellule radicali.

Utilizzando radici di piante intere è stato dimostrato che le SU sono in grado di stimolare per se l'estruzione di protoni nel mezzo esterno mediata dalla PM  $\text{H}^+\text{-ATPasi}$  (Pinton et al., 1997); Varanini et al. (1993) hanno inoltre dimostrato in preparati isolati di PM la capacità di frazioni a basso peso molecolare di stimolare l'attività specifica della  $\text{H}^+\text{-ATPasi}$ .

L'attività della PM  $\text{H}^+\text{-ATPasi}$ , dopo un breve trattamento (4 ore) delle radici, è risultata essere stimolata da una frazione umica

(WEHS), caratterizzata da molecole di ridotte dimensioni, estratta con acqua da torba (Pinton et al., 1999b). Dato che non era possibile osservare alcuna variazione sulla quantità dell'enzima, quest'effetto è stato attribuito ad un meccanismo di regolazione post-trascrizionale. D'altro canto, frazione umiche ad alto peso molecolare estratte da vermi-compost fresco e contenente acido indolacetico (IAA) mostrano un'azione stimolante sia sull'attività che sulla quantità della proteina di membrana (Canellas et al., 2002). Più recentemente è stato suggerito che l'effetto esercitato dalle sostanze umiche possa essere esercitato ad un livello di espressione genica con coinvolgimento di specifiche isoforme della PM H<sup>+</sup>-ATPasi (Quaggiotti et al., 2004).

Gli effetti sulla PM H<sup>+</sup>-ATPasi possono essere rilevanti per l'assorbimento di ioni nelle cellule radicali dalla soluzione del suolo (Varanini e Pinton, 2001). Ai fini della nutrizione delle piante di particolare rilievo è anche la capacità delle sostanze umiche di modificare la morfologia radicale consentendo un'estensione della superficie a contatto con i componenti del suolo (Nardi et al., 2002).

L'insieme di queste modificazioni morfologiche e fisiologiche rivestono particolare importanza nel caso dell'assorbimento di ioni poco mobili nel suolo quali il Fe perchè la concentrazione del micronutriente nella soluzione è fortemente dipendente dalla presenza nel suolo di composti organici capaci di complessare, con diverso grado di affinità, il Fe<sup>3+</sup> tra cui acidi organici e siderofori di origine vegetale e microbica e frazioni solubili a basso pesomolecolare della sostanza organica umificata. È stato dimostrato che la frazione umica WEHS è in grado di aumentare la quantità di Fe presente nella soluzione del terreno attraverso la formazione di complessi con il micronutriente (Cesco et al., 2000). Questi ultimi possono essere utilizzati dalle piante come substrato naturale della Fe<sup>III</sup>-chelato riduttasi radicale (Cesco et al., 2002) anche in condizioni particolarmente limitanti la disponibilità del micronutriente (Pinton et al., 1999a) consentendo un pronto recupero dei sintomi fogliari da Fe-carenza.

Studi recenti hanno evidenziato che frazioni umiche a basso peso molecolare sono in grado di promuovere livelli di mobilizzazione di <sup>59</sup>Fe da una fonte scarsamente disponibile (<sup>59</sup>Fe-idrossido) prossimi a quelli ottenibili in presenza di fi-

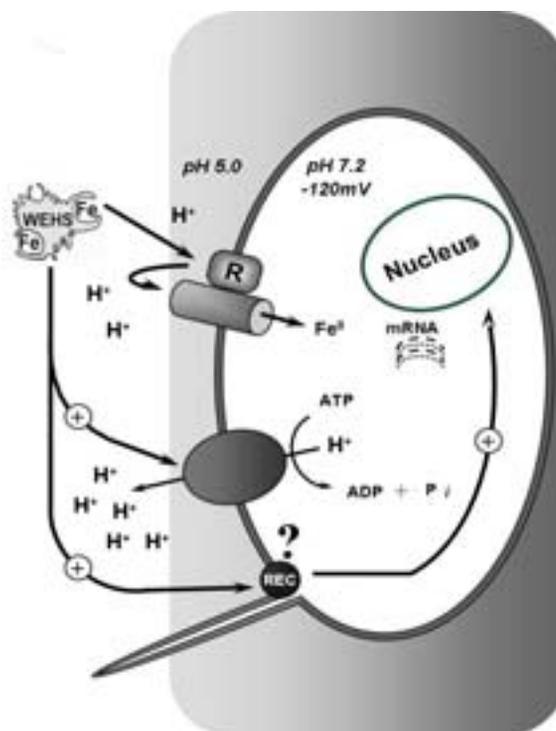


Figura 5. Rappresentazione schematica della possibile interazione tra molecole umiche e meccanismi di acquisizione del Fe in radici di piante dicotiledoni (Modificato da Varanini e Pinton, 2006). (R: FeIII-chelato riduttasi; REC: ipotetico recettore delle molecole umiche).

Figure 5. Schematic representation of the possible interaction between humic molecules and Fe absorption mechanisms in dicotyledonous plant roots (modified from Varanini and Pinton, 2006). (R: Fe-chelate reductase; REC: hypothetical receptor of humic molecules).

tosiderofori (PS) e che i complessi ferro-umati così formati potevano essere utilizzati con efficienza maggiore rispetto ad altre fonti naturali organiche del micronutriente quali Fe-PS e Fe-citrato (Cesco et al., 2006b). È evidente da quanto sopra descritto che frazioni umiche del tipo WEHS possono svolgere una funzione multipla nei confronti della nutrizione ferrica sia agendo come molecole complessanti capaci di mantenere il Fe in una forma disponibile per le piante sia come modulatori delle attività preposte all'acquisizione del micronutriente (fig. 5).

## Conclusioni

Come illustrato nel testo, oltre alle peculiari dinamiche dell'azoto nel suolo che ne determina-

no la possibilità di consistenti perdite, caratteristiche intrinseche del meccanismo di acquisizione delle forme azotate proprie dei vegetali, contrastano con il raggiungimento di una maggiore efficienza d'uso del nutriente. Infatti fattori quali il ciclo futile dell'azoto attraverso la membrana plasmatica (efflusso), la retro-regolazione dei sistemi HATS per il nitrato e l'ammonio in piante adeguatamente rifornite di azoto, la diminuzione dell'assorbimento di azoto causata da fattori ambientali quali luce e temperatura, facilitano abbondanti perdite di azoto dal suolo. Si evidenzia quindi la necessità di definire in un contesto che coinvolga anche il destino dell'azoto all'interno della pianta, i meccanismi biochimici e molecolari che controllano il processo di acquisizione dell'azoto. È evidente che per il raggiungimento di un miglioramento dell'efficienza nutrizionale si debba operare attraverso un approccio che integri studi genetici, fisiologici e agronomici (Hirel et al., 2007).

Nell'ottica di sviluppare sistemi colturali sostenibili, appare di notevole importanza il progresso delle conoscenze dei meccanismi biochimici e dei processi fisiologici alla base dell'acquisizione di un micronutriente essenziale quale il ferro. Nel considerare questi aspetti è indispensabile anche tener conto del ruolo che componenti del suolo possono avere nell'influenzare lo sviluppo e la funzionalità dell'apparato radicale. Da ciò emerge la necessità di approfondire ulteriormente l'approccio multidisciplinare allo studio integrato del sistema suolo-pianta e in particolare dell'ambiente rizosferico.

## Bibliografia

Aslam M., Travis R.L., Rains D.W. 1996. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. *Plant Physiology*, 112:1167-1175 .

Baligar V.C., Bennett O.L. 1986. Outlook on fertilizer use efficiency in the tropics. *Fert. Res.*, 10: 83-96.

Baligar V.C., Fageria N.K., He Z.L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32:921-950.

Barber S.A. 1995. *Soil nutrient bioavailability*. John Wiley and Sons, New York.

Byrnes B.H., Bumb B.L. 1998. Population growth, food production and nutrient requirements. In: Z. Rengel (ed.): *Journal of Crop Production*, 1-27. The Haworth Press, New York.

Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Façanha A.L., Façanha A.R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130:1951-1957.

Cesco S., Römheld V., Varanini Z., Pinton R. 2000. Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163:285-290.

Cesco S., Nikolic M., Römheld V., Varanini Z., Pinton R. 2002. Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble 59Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant and Soil*, 241:121-128.

Cesco S., Rombolà A.D., Tagliavini M., Varanini Z., Pinton R. 2005. Root exudates of grasses improve Fe uptake in a citrus rootstock sensitive to Fe-deficiency. In: Li et al. (eds.): *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*, 480-481. Tsinghua University Press, Beijing, China.

Cesco S., Rombolà A.D. 2006. Intercropping and Nutrient Management at the Rhizosphere. In: R. Goodmann (ed.): *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, 1-3. Taylor and Francis Group, LLC, New York.

Cesco S., Rombolà A.D., Tagliavini M., Varanini Z., Pinton R. 2006a. Phytosiderophores released by graminaceous species promote <sup>59</sup>Fe uptake in citrus. *Plant and Soil*, 287:223-233.

Cesco S., Varanini Z., Pinton R. 2006b. Use of Fe complexed to water soluble humic substances by dicotyledonous plants: mechanisms and efficiency. 13<sup>th</sup> International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants Montpellier, France. S1-O-4, 25.

Chopin F., Orsel M., Dorbe M.F., Chardon F., Truong H.N., Miller A.J., Krapp A., Vedele F.D. 2007. The Arabidopsis ATNRT2.7 Nitrate Transporter Controls Nitrate Content in Seeds. *The Plant Cell Preview*, www.aspb.org 2007, American Society of Plant Biologists.

Clement C.R., Hopper M.J., Jones L.H.P. 1978. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II. Effect of light, defoliation and relationship to CO<sub>2</sub> flux. *Journal of Experimental Botany*, 29:1173-1183.

Crawford N.M., Glass A.D.M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3:389-395.

Curié C., Briat J.F. 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54:183-206.

Curié C., Panaviene Z., Loulerque C., Dellaporta S., Briat J.F., Walker E.L. 2001. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(II) uptake. *Nature*, 409:346-349.

Evenson R.E. 1999. Global and local implications of biotechnology and climate change for future food supplies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:5921-5928.

Forde B.G., Clarkson D.T. 1999. Nitrate and ammonium

- nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research*, 30:1-90.
- Forde B.G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. physiological and molecular perspectives. *Biochemistry and Biophysica Acta*, 1465:219-235.
- Glass A.D.M., Erner Y., Kronzucker H.J., Schjoerring J.K., Siddiqi M.Y., Wang M.Y. 1997. Ammonium fluxes into plant roots: energetics, kinetics and regulation. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 160:261-268.
- Glass A.D.M., Brito D.T., Kaiser B.N., Kinghorn J.R., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi M.Y., Unkles S.E., Vidmar J.J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53 (370):855-864.
- Guerrero M.G., Vega J.M., Losada M. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 32:169-204.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, **June 7**; **17556767**.
- Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. 1996. Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  influx in spruce. *Plant Physiology*, 110:773-779.
- Lee R.B., Ratcliffe R.G. 1991. Observations on the sub-cellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using in vivo  $^{14}\text{N}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, 183:359-367.
- Lee R.B., Drew M.C. 1989. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany*, 40:741-752.
- Locci G., Santi S., Monte R., Pinton R., Varanini Z. 2001. Involvement of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in nitrate uptake by maize genotypes. In: Horst W.J. et al. (eds.): *Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems*, 184-185. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Loneragen J.P. 1997. Plant nutrition in 20th and perspectives for the 21st century. *Plant Soil*, 196:163-174.
- Loqué D., von Wiren N. 2004. Regulatory levels for the transport of ammonium in plants roots. *Journal of Experimental Botany*, 55:1293.
- Lucena J.J. 2003. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in Strategy I plants. *Journal of Plant Nutrition*, 26:1969-1984.
- Ludwig U., von Wiren N., Frommer W.B. 2002. Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:13548-13555.
- Marschner H., Römheld V., Kissel M. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 9:695-713.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press Limited, Londra.
- Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, 34:1527-1536.
- Okamoto M., Vidmar J.J., Glass A.D.M. 2003. Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision. *Plant Cell Physiology*, 44:304-317.
- Pinstrup-Andersen P., Pandya-Lorch R., Rosegrant M.W. 1999. *World food prospects: Critical issues for the early twenty-first century*. 2020 Vision Food Policy Report, International Food Policy Research Institute, Washington D.C.
- Pinton R., Cesco S., De Nobili M., Santi S., Varanini Z. 1998. Water and pyrophosphate extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biology and Fertility of Soils*, 26:23-27.
- Pinton R., Cesco S., Iacoletti G., Astolfi S., Varanini Z. 1999b. Modulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant and Soil*, 217:155-161.
- Pinton R., Cesco S., Santi S., Agnolon F., Varanini Z. 1999a. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil*, 210:145-157.
- Pinton R., Cesco S., Santi S., Varanini Z. 1997. Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, 20:857-869.
- Quaggiotti S., Reperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55 (398):803-813.
- Raun W., Johnson G.V. 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal*, 91:357-363.
- Rawat S.R., Silim S.N., Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. 1999. AtAMT1 gene expression and  $\text{NH}_4^+$  uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant Journal*, 19:143-152.
- Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L., Guerinot A. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397(6721):694-697.
- Rombolà A.D., Baldi E., Franceschi A., Ammari T., Minguéz Paramio J., Tagliavini M. 2003. Prevenzione della clorosi ferrica dell'actinidia (*Actinidia deliciosa*) mediante consociazione temporanea con specie Graminacee. *Atti Convegno Nazionale dell'Actinidia*, 21 Novembre 2003, Verona.
- Santi S., Locci G., Pinton R., Cesco S., Varanini Z. 1995. Plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPasi in maize roots induced for  $\text{NO}_3^-$  uptake. *Plant Physiology*, 109:1277-1283.
- Santi S., Locci G., Monte R., Pinton R., Varanini Z. 2003.

- Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 54 (389):1851-1864.
- Santi S., Cesco S., Varanini Z., Pinton R. 2005. Two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:287-292.
- Scherr S.J. 1999. Soil degradation, a threat to developing-country food security by 2020. In: *Food, Agriculture, and the Environment Discussion Paper 27*. International Food Policy Research Institute. Washington, DC.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J. 1991. Studies of the uptake of nitrate in barley: III Compartmentation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Journal of Experimental Botany*, 42:1455-1463.
- Tagliavini M., Rombolà A.D. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *European Journal of Agronomy*, 15:71-92.
- Tischer R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell and Environment*, 23:1005-1024.
- Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72:705-713.
- Ullrich W.R., Larsson M., Larsson C.M., Lesch S., Novacky A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G-1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum*, 61:369-376.
- Ullrich W.R., Novacky A. 1981. Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba* G1. *Plant Science Letters*, 22:211-217.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157:423-447.
- Varanini Z., Pinton R., De Biasi M.G., Astolfi S., Maggioni A. 1993. Low molecular weight humic substances stimulate H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 153:61-69.
- Varanini Z., Pinton R. 2001. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds.): *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 141-157. Marcel Dekker Inc., New York.
- Varanini Z., Pinton R. 2007. Root membrane activities relevant to nutrient acquisition at the plant-soil interface. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds.): *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 151-172. Second Edition, Marcel Dekker Inc., New York.
- Vidmar J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schjoerring J.K., Touraine B., Glass A.D.M. 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporters genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology*, 123:307-318.
- Wang M.Y., Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian L.V. 1994. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant Physiology*, 104:899-906.
- Wang M.Y., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Glass A.D.M. 1993a. Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and sub-cellular distribution of <sup>13</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Plant Physiology*, 103:1249-1258.
- Wang M.Y., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Glass A.D.M. 1993b. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of <sup>13</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx across the plasmalemma. *Plant Physiology*, 103:1259-1267.
- Welch R.M., Graham R.D. 2000. A new paradigm for world agriculture: productive, sustainable, nutritious, healthful food systems. *Food and Nutrition Bulletin*, 21:361-366.
- White P.J. 1996. The permeation of ammonium through a voltage-independent K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of rye roots. *Journal of Membrane Biology*, 152:89-99.
- Zuo Y.M., Zhang F.S., Li X.L., Cao Y.P. 2000. Studies on the improvement in iron nutrition of peanut by intercropping with maize on a calcareous soil. *Plant and Soil*, 220:13-25.