

Roggero, Pier Paolo; Ballatore, Benedetto Francesco; Sulas, Leonardo
(2003) *Metodologie per la quantificazione in campo dell'azotofissazione simbiotica delle leguminose*. Rivista di agronomia, Vol. 37 (2), p. 207-226.
ISSN 0035-6034.

<http://eprints.uniss.it/3757/>

Metodologie per la quantificazione in campo dell'azotofissazione simbiotica delle leguminose

Pier Paolo Roggero, Benedetto Ballatore, Leonardo Sulas

Riassunto

Il lavoro si inserisce nell'ambito delle attività relative al progetto di rilevante interesse nazionale (PRIN) "Fisiologia della produzione e azotofissazione di leguminose foraggere in sistemi agricoli ecocompatibili" e ha come obiettivo quello di fare il punto sulle principali metodologie impiegabili per la quantificazione in campo dell'azotofissazione simbiotica delle leguminose. Sono stati illustrati gli assunti, le procedure, i vantaggi e i limiti di applicazione dei seguenti metodi: bilancio dell'azoto (NB), riduzione dell'acetilene (ARA), riduzione di $^{15}\text{N}_2$ (IR), diluizione isotopica (ID), abbondanza naturale (NA) e metodo dell'ureide. Sono state inoltre descritte alcune applicazioni relative alla quantificazione dell'azoto ipogeo delle leguminose e del trasferimento dell'azoto fissato alla coltura in successione.

Lo sviluppo delle metodologie basate sulla discriminazione isotopica dell'azoto, in particolare il metodo ID e NA, hanno permesso di superare molti dei limiti di applicazione dei metodi più tradizionali (es. ARA e NB), ma il loro impiego non è scervato da errate interpretazioni se non vengono rispettati gli assunti fondamentali, tra i quali il principale è quello della irregolare distribuzione spazio-temporale dell'arricchimento isotopico (metodo ID) e della scelta della specie di riferimento. I modelli di simulazione possono contribuire ad attenuare questi problemi. Per la quantificazione dell'azoto ipogeo delle leguminose derivante da azotofissazione, che rappresenta un elemento di grande rilevanza da un punto di vista agronomico, non è stata messa a punto una procedura standard, in quanto occorre adattare la metodologia alla specie e al sito sperimentale. Occorre quindi investire, in particolare a livello nazionale, sullo sviluppo di metodologie per la quantificazione dell'azoto delle parti ipogee e della quota di azoto fissato che, attraverso i residui colturali, entra nel ciclo dell'azoto, tenendo conto anche dell'esigenza di valorizzare i risultati attraverso metodi che facilitino il coinvolgimento dei principali attori delle filiere produttive basate sulle leguminose.

Parole chiave: azotofissazione simbiotica, bilancio azoto, riduzione isotopica, diluizione isotopica, abbondanza naturale, ureide, azoto ipogeo, sistemi colturali.

Summary

METHODS FOR THE FIELD MEASUREMENT OF SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF LEGUMES

This paper has been written in the context of the Italian national research project (PRIN) "Physiology of production and nitrogen fixation of forage legumes in eco-compatible farming systems", with the aim of analysing the state of the art on the main methods to estimate symbiotic nitrogen fixation of legumes in the field. Assumptions, procedures, advantages and limits of the following methods are illustrated: nitrogen balance (NB), acetylene reduction assay (ARA), $^{15}\text{N}_2$ isotope reduction (IR), ^{15}N isotopic dilution (ID), ^{15}N natural abundance (NA) and xylem sap analysis. Some applications on the estimate of below-ground nitrogen of legumes and the implications on rotations and mixtures are also described.

The development of methods based on the nitrogen isotopic discrimination, particularly ID and NA methods, have substantially contributed to overcome the limitations of old methods such as ARA and NB. However, new methods can be misused if fundamental assumptions are not satisfied, such as the time-space uniformity of soil ^{15}N enrichment and the similar N

Roggero P.P., Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche, via Salvador Allende – 60131 Ancona.

Ballatore B., Dipartimento di Agronomia, Coltivazioni erbacee e Pedologia, Università degli Studi di Palermo, viale delle Scienze – 90128 Palermo.

Sulas L., CNR – Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo, c/o Dipartimento di Scienze agronomiche e Genetica vegetale agraria, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Autore corrispondente: Roggero P.P., tel. 071 2204916, fax 071 2204858; e-mail: roggero@univpm.it

Lavoro eseguito nell'ambito del programma MURST COFIN "Fisiologia della produzione e azotofissazione di leguminose foraggere in sistemi agricoli ecocompatibili". Coordinatore Scientifico Prof. Andrea Cavallero.

Gli autori hanno contribuito al lavoro in parti uguali all'impostazione e alla redazione del lavoro. Pier Paolo Roggero ha curato in particolare le parti relative al metodo IR, ID e alle metodologie per la quantificazione dell'azoto ipogeo e nel sistema colturale; Benedetto Ballatore ha curato in particolare le parti relative al metodo NA e dell'Ureide; Leonardo Sulas ha curato in particolare le parti relative al metodo ARA e NB.

uptake dynamics of the fixing and reference species. Modelling approaches can help to mitigate the assumption violations.

It is not available a standard methodology to assess the below-ground fixed nitrogen of any legume species, as specific procedures should be developed for each species and experimental site. As this is a relevant point from an agronomic perspective, further research is needed to assess below-ground nitrogen of legumes and the amount of symbiotic fixed nitrogen which enters the nitrogen cycle. Particular attention should also be deserved to the development of adequate methods to exploit the results of the field experiments involving main stakeholders of the legume-based production systems.

Key words: symbiotic N₂-fixation, nitrogen balance, ¹⁵N isotope reduction, ¹⁵N isotope dilution, natural abundance, xylem sap analysis, below-ground nitrogen, cropping systems.

Lista delle principali abbreviazioni usate nel testo:

Simbolo	Descrizione
ARA	riduzione dell'acetilene
ID	Diluizione isotopica
IR	riduzione isotopica
NA	abbondanza naturale
NB	bilancio dell'azoto
Nbal	bilancio dell'azoto
Ndfa	azoto derivante da fissazione simbiotica atmosferica
Ndfa _{cer}	N derivante da fissazione simbiotica assorbito dal cereale in successione
R	rapporto isotopico $^{15}\text{N}/(^{14}\text{N}+^{15}\text{N}) \cong ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
RUN	abbondanza relativa dell'ureide-N
$\delta^{15}\text{N} \text{‰}$	eccesso di ¹⁵ N espresso come ‰ rispetto al riferimento dell'N ₂ atmosferico (0,3663‰). Cfr. equazione (14)

Introduzione

Obiettivo di questa nota è quello di dare un contributo allo sviluppo di metodologie sperimentali idonee a quantificare l'azotofissazione simbiotica delle leguminose in condizioni di pieno campo, attraverso l'analisi critica della letteratura scientifica e le esperienze dirette acquisite dagli autori e dai partecipanti al Progetto di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) "Fisiologia della produzione e azotofissazione di leguminose foraggere in sistemi agricoli ecocompatibili" (MURST-Cofin97), di seguito chiamato "PRIN Azotofissazione".

L'uso improprio e i problemi pratici relativi ad alcune metodiche di quantificazione dell'azotofissazione sono spesso legati alla scarsa conoscenza degli assunti delle diverse metodologie (Danso et al., 1993).

Molte *review* e lavori sperimentali hanno preso in considerazione vantaggi e svantaggi dei diversi metodi. Tra queste segnaliamo Boddei (1987); Knowles e Blackburn (1993); Danso (1995); Chalk (1998); Carranca et al. (1999); Chalk e Ladha (1999); Herridge e Peoples (1990); Marriot e Haysted (1993); Papastylianou (1993); Pate et al. (1994); Rennie (1984); Unkovich et al. (1996); Unkovich et al. (1994); Unkovich e Pate (2000); Wilson et al. (1995); Witty e Minchin (1988).

In questo lavoro saranno illustrati assunti, procedure, punti di forza e limiti di applicazione delle metodologie più usate per la quantificazione dell'azotofissazione simbiotica delle leguminose, nell'intento di contribuire a ridurre le possibilità di uso improprio delle diverse metodologie e di migliorare l'efficacia delle sperimentazioni agronomiche sull'azotofissazione simbiotica delle leguminose nelle specifiche condizioni italiane.

Il lavoro prenderà in esame principalmente gli aspetti che hanno rilevanza per una corretta interpretazione, da un punto di vista agronomico, dei dati raccolti in campo con diverse metodologie.

Dal XIX secolo, quando fu scoperta la capacità azo-

tofissatrice da parte di microrganismi simbiotici delle leguminose, gli avanzamenti delle conoscenze sono stati sempre legati allo sviluppo di efficaci metodologie di misura. Sono tre le principali tappe tecnologiche che hanno facilitato l'avvio di studi sull'azotofissazione:

- lo sviluppo di metodi affidabili per la misura del contenuto di azoto in materiali organici;
- la scoperta e l'uso di isotopi dell'azoto come traccianti;
- lo sviluppo di altri metodi semplici, sensibili e indiretti come quello della riduzione dell'acetilene.

I metodi oggi disponibili e più utili possono essere classificati in quattro gruppi:

- metodo del bilancio dell'azoto (NB);
- metodo della riduzione dell'acetilene (ARA);
- metodi che fanno uso dell'isotopo ¹⁵N;
- metodo dell'ureide.

Con la riduzione dei costi per l'accesso alla spettrometria di massa, si sono aperte prospettive interessanti per l'impiego di metodiche già note ma sinora poco utilizzate per la ricerca agronomica, come le tecniche basate sull'impiego di isotopi dell'azoto (Knowles e Blackburn, 1993). Nell'ultimo decennio, l'impiego di queste metodologie ha permesso lo sviluppo di numerose ricerche sulla quantificazione dell'azotofissazione delle leguminose in condizioni ecologiche differenti, finalizzate spesso all'applicazione di tecniche agronomiche che favorissero l'aumento dell'efficienza di azotofissazione e di trasferimento dell'azoto fissato dalla leguminosa a specie di altre famiglie di interesse agrario, coltivate in consociazione o in successione (Giller e Cadish, 1995; Papastylianou, 1993; Peoples et al., 1995).

Nell'ambito del progetto "PRIN Azotofissazione" sono stati utilizzati da tutti i partecipanti il metodo del bilancio azotato (NB) e il metodo della diluizione dell'isotopo stabile ¹⁵N (ID). Le unità di ricerca dell'Università di Ancona e Torino hanno anche utilizzato il metodo dell'abbondanza naturale (NA). In questa nota sono stati

descritti in maniera più sintetica anche altri metodi utilizzati per misurare la dinamica dell'azotofissazione nel sistema suolo-pianta. Di ciascun metodo, sono stati illustrati gli assunti e i dettagli procedurali e discussi i punti di forza e i limiti di applicazione, con particolare riferimento ai metodi più utilizzati in campo agronomico.

Il metodo del bilancio azotato (NB)

Assunti

Nota anche come metodo della differenza di azoto accumulato tra leguminosa e specie non azotofissatrici (nfs) o del confronto tra leguminosa e graminacea, è il metodo di stima dell'azotofissazione più semplice e utilizzato da più tempo.

Stima l'azoto fissato in base alla differenza di produzione di azoto tra leguminosa e specie non azotofissatrici nello stesso suolo. Questo metodo è basato sul presupposto che la quantità di azoto presente nelle piante non azotofissatrici provenga interamente dal suolo, che leguminosa e specie nfs assorbano lo stesso quantitativo di azoto disponibile nel suolo e che l'azoto in più contenuto nella leguminosa provenga esclusivamente da azotofissazione, che viene così stimata per differenza.

Descrizione

La quantità di azoto fissato (Nfiss, in kg ha⁻¹) da una leguminosa è data da:

$$N_{fiss} = N_{leg} - N_{nfs} \quad (1)$$

dove:

N_{leg}: azoto asportato dalla leguminosa;

N_{nfs}: azoto asportato dalla coltura di riferimento, in analoghe condizioni ambientali.

La procedura consiste nel determinare la produzione totale di sostanza secca ed il tenore in azoto totale (metodo Kjeldahl) della leguminosa e della specie di riferimento. La quantità di azoto prodotta dalla due specie si ottiene moltiplicando la produzione di fitomassa per il contenuto percentuale di azoto sulla sostanza secca; la quantità di azoto derivante da azotofissazione si ottiene sottraendo alla produzione unitaria di azoto della leguminosa, quella della specie di controllo. Per determinare la percentuale di azoto derivante da azotofissazione (%Ndfa) si rapporta la quantità di azoto fissato alla quantità di azoto totale prodotta dalla leguminosa.

Lo stesso metodo si può utilizzare anche per stimare la quantità di azotofissazione in un miscuglio di graminacea e leguminosa (Wood, 1996).

Per tener conto del fatto che l'azoto del suolo nelle parcelle della leguminosa può essere superiore a quello presente nelle parcelle della graminacea, si può calcolare anche la differenza del contenuto di azoto nel suolo (nitro residuo) delle due parcelle, determinato subito dopo lo sfalcio, secondo quanto proposto da Stülpnagel (1982):

$$N_{fiss} = N_{leg} - N_{nfs} + (N_{suolo\ leg} - N_{suolo\ nfs}) \quad (2)$$

Il metodo assume che i processi mineralizzazione, lisciviazione e denitrificazione siano identici in entrambe le colture.

Come specie di riferimento si utilizzano, in genere, graminacee (frumento, orzo, loglio) o anche la stessa leguminosa non inoculata, oppure inoculata con ceppi

batterici difettivi, o isolinee non azotofissatrici (non nodulanti), presenti in *Glycine*, *Cicer*, *Pisum*, *Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*. Queste ultime, in teoria, sono in grado di dare i migliori risultati, sebbene sia stata messa in evidenza un'influenza della nodulazione sull'attività dell'apparato radicale. Per ulteriori dettagli sulla scelta delle specie di riferimento si rimanda al capitolo sul metodo ID.

Punti di forza

- È il metodo di stima dell'azotofissazione in campo più semplice ed economico;
- occorre determinare solo la produzione ed il tenore in azoto, che comunque sono necessari anche per tutti gli altri metodi;
- si effettua una misura diretta dell'accrescimento della pianta e dell'azotofissazione nel tempo, permettendo un'integrazione dei risultati su tutta la stagione.

Limiti di applicazione

- Il metodo del confronto fornisce stime molto approssimative, spesso insufficienti ad ottenere indicazioni utili. Infatti, gli assunti di base costituiscono una eccessiva semplificazione del sistema e non sono sempre accettabili, come quello che la quantità di azoto assorbita dal suolo da una specie nfs e da una leguminosa sia simile, anche in relazione alla diversa efficienza d'uso dei fertilizzanti.
- È sensibile alle caratteristiche fisiologiche e produttive della specie di controllo. Le due specie dovrebbero almeno avere apparati radicali molto simili in termini di profondità, rizosfera esplorata, efficienza di assorbimento dell'azoto. Il ritmo di crescita delle due specie dovrebbe essere simile. Inoltre, altri fattori in grado di influenzare l'accrescimento e lo sviluppo delle piante, ad esempio la disponibilità idrica, la tolleranza ad avversità biotiche ed abiotiche, dovrebbero essere simili in entrambe le specie. Ulteriori errori possono derivare dalla mancanza di precisione nella misura dell'azoto minerale in forma assimilabile nel suolo e dalla profondità dell'apparato radicale in relazione alla disponibilità di azoto nei vari strati. L'abbinamento di una leguminosa con una pianta di riferimento adeguata rimane il problema principale di questo metodo. Si possono verificare, infatti, tre differenti situazioni:
 - 1) assimilazione degli stessi quantitativi di azoto dal terreno da parte delle due specie con conseguente stima accurata di azotofissazione;
 - 2) in suoli con limitate disponibilità di azoto, le piante nodulate e più vigorose hanno un apparato radicale più profondo, in grado di esplorare un volume maggiore di suolo; l'azotofissazione potrebbe essere sovrastimata poiché la leguminosa è in grado di utilizzare più azoto dal suolo della specie di riferimento;
 - 3) una leguminosa con una simbiosi attiva richiede ed utilizza, in genere, meno azoto dal suolo rispetto alla specie di riferimento.

Secondo alcuni autori, con questo metodo si possono ottenere i risultati migliori in suoli con contenuti di azoto molto bassi, nei quali la percentuale di Ndfa è in genere elevata (Danso, 1995). Tuttavia, è stato anche dimostrato che non sempre questo è vero (Mc Neill et al., 1996), e che quindi molti assunti su cui è basato il metodo non sono del tutto validi.

Discussione

Secondo Rennie (1984), che riporta numerosi esempi soprattutto in leguminose da granella, il metodo della differenza fornisce stime molto vicine, in termini di azoto fissato e di % Ndfa, rispetto al metodo ID, solo quando le due specie hanno la stessa efficienza di assorbimento del concime azotato o, in assenza di concimazione azotata, dell'azoto del suolo. Tra i fattori che possono influenzare l'efficienza di assorbimento dell'azoto, vi sono la cultivar, il ceppo di rizobio e l'aggiunta di concime azotato. Pertanto, il maggiore inconveniente del metodo NB è che la precisione di stima è troppo dipendente dalle condizioni locali.

Diversi autori (Hardy e Holstein, 1977; Carranca et al., 1999) hanno concluso che questo metodo sottostima, in genere, l'azotofissazione poiché la leguminosa utilizza meno azoto del suolo rispetto alla specie di riferimento. In effetti, nel caso di pascoli basati sul miscuglio leguminose graminacee si possono riscontrare con questo metodo delle stime negative, per via del trasferimento di azoto dalla leguminosa alle graminacee.

Nonostante le numerose critiche al metodo, bisogna però osservare che sia le leguminose, sia la maggior parte delle graminacee prative, sono capaci di utilizzare con molta efficienza l'azoto disponibile nel suolo, come evidenziato dal fatto che le concentrazioni di azoto minerale nella soluzione del terreno si mantengono costantemente molto basse, anche a seguito di sostanziali fertilizzazioni dei prati (Grignani et al., 1997). Pertanto è spesso valida l'assunzione che la quantità di azoto assorbito direttamente dal suolo sia analoga per i due gruppi di specie citati. I risultati delle ricerche condotte nell'ambito del progetto "PRIN Azotofissazione" confermano sostanzialmente queste osservazioni, tuttavia i risultati ottenuti sono spesso influenzati in misura rilevante dalla specie di controllo.

Il confronto tra metodologie di valutazione ha evidenziato che, talvolta, la stima dell'azotofissazione con il metodo NB è inferiore rispetto a quella ottenuta con il metodo ID. In alcune località, i due metodi hanno fornito risultati equivalenti, quando riferiti ai valori medi annuali, ma se l'analisi è approfondita a livello dei singoli tagli e del diverso regime di utilizzazione, emergono differenze sostanziali (Eusebi et al., 2003).

Il metodo della riduzione dell'acetilene (ARA)

Assunti

Questo metodo, ideato alla fine degli anni sessanta, è basato sul fatto che il complesso enzimatico della nitrogenasi, presente nei noduli radicali indotti dai rizobi e responsabile dell'azotofissazione, in quanto riduce N_2 a NH_4^+ , è in grado di ridurre anche composti diversi da N_2 , con dimensioni e configurazione simili (triplo legame). Infatti, la nitrogenasi riduce anche l'acetilene (C_2H_2), producendo etilene (C_2H_4), misurabile per via gas-cromatografica (Marriott e Haystead, 1993) e quindi indicativo dell'attività dell'enzima nei noduli radicali. Inoltre, il tasso di attività della nitrogenasi non è influenzato dal cambio di substrato (da N_2 a C_2H_2) o dal cambio del prodotto finale (da NH_4 a C_2H_4).

Descrizione

Intere piante o radici nodulate vengono poste in contenitori a tenuta ed esposti ad atmosfera contenente ace-

tilene al 10%. Dopo un periodo di incubazione, variabile da mezz'ora a due o più ore a seconda del protocollo, l'atmosfera viene campionata e sottoposta ad analisi mediante gas-cromatografo per l'etilene prodotto nel tempo di esposizione. L'attività della nitrogenasi viene espressa, in genere, in moli di etilene prodotti per pianta per ora.

Il saggio ARA si può effettuare con diversi tipi di apparecchiature:

- Contenitori chiusi impermeabili ai gas, all'interno dei quali vengono poste radici nodulate estratte dal terreno o zolle contenenti radici e parte della fitomassa epigea (misurazioni *ex situ*). Così come per i sistemi a flusso, è necessario prelevare campioni distruttivi di terra e cotico erboso e radici con noduli.
- Apparecchi da campo posizionati direttamente sul cotico erboso e infissi nel terreno fino a 5-10 cm di profondità. In questo caso è possibile effettuare misure *in situ*.
- Sistemi a flusso di gas. Questi sistemi richiedono un elaborato sistema di pompaggio del gas per far circolare una certa quantità di acetilene nell'aria della camera di saggio.

Quando si usa la tecnica ARA in campo, le aree campione del cotico vengono esposte a concentrazioni di acetilene sufficienti a saturare la nitrogenasi nei noduli delle leguminose.

La sorgente più conveniente di acetilene è un contenitore cilindrico contenente questo gas a un elevato grado di purezza, in alternativa è possibile ottenerlo direttamente da carburo di calcio. L'acetilene viene iniettato velocemente all'interno del contenitore per mezzo di una grossa siringa fino a raggiungere una proporzione di circa il 10% nell'aria interna del contenitore. Qualche tempo dopo l'esposizione iniziale, l'etilene prodotto dal sistema azotofissatore viene misurato in un campione di gas. Sono inclusi controlli in grado di determinare la produzione di etilene indipendente dall'acetilene, l'etilene contaminante e, eventualmente, la fissazione non simbiotica.

Il metodo ARA permette una misura indiretta dell'azotofissazione ottenuta attraverso la valutazione dell'attività della nitrogenasi. I quantitativi di acetilene ridotti devono essere trasformati in azoto fissato attraverso un coefficiente di conversione. Per la stima dell'azotofissazione si assume, teoricamente, che la riduzione di 3 moli di acetilene equivale alla riduzione di 1 mole di N_2 ; in tal caso il rapporto stechiometrico dovrebbe essere di 3:1.

Il metodo dell'acetilene è stato molto usato nelle ricerche sull'azotofissazione delle leguminose di prati e pascoli.

Punti di forza

Il metodo è rapido, semplice e sensibile e risulta molto utile per una verifica dell'attività della nitrogenasi (Bazzicalupo et al., 2000). Inoltre, il metodo è economico rispetto ad altri che richiedono la disponibilità di uno spettrometro di massa. La precisione e la sensibilità dell'analisi cromatografica dell'etilene è alta.

In particolare questo saggio è adatto per misurare risposte a breve termine a fattori ambientali ben definiti come il tipo suolo, le condizioni meteorologiche, la defogliazione dovuta al pascolamento, etc.

Nonostante gli svantaggi, descritti più avanti, il metodo rimane valido per studi qualitativi sull'azotofissazione e per la verifica preliminare di materiale biolo-

gico prima di intraprendere studi più approfonditi basati sulla discriminazione isotopica.

Limiti di applicazione

Le misurazioni possono essere effettuate solo per periodi limitati di tempo, ma ci sono grandi differenze di risposta al metodo nel corso di una stessa giornata o durante una stagione. La misura di queste variazioni è quindi necessaria per stime a lungo termine. Questo metodo inoltre non si presta bene a sperimentazioni di pieno campo, per l'incertezza nella diffusione dell'acetilene e per la difficoltà di un recupero quantitativo dell'etilene.

Sono tre i problemi principali del metodo che rendono la quantificazione dell'azotofissazione non attendibile in valore assoluto:

1. Il rapporto tra acetilene ridotto ed azoto fissato, varia notevolmente e richiede quindi accurate calibrazioni dell'etilene prodotto (Ledgard e Steele, 1992). Sperimentazioni condotte successivamente allo sviluppo del metodo ARA utilizzando come verifica il metodo della diluizione isotopica, hanno permesso di valutare che il rapporto stechiometrico può fluttuare, giornalmente, da 0,5:1 a 10:1 a causa di fattori ambientali e legati alla pianta (età, stato idrico e stadio di sviluppo) che agiscono indipendentemente sulla assimilazione e riduzione di acetilene e azoto. L'accuratezza potrebbe essere migliorata adottando procedure di saggio standardizzate (es. tempo di incubazione, temperatura, volume del contenitore, distacco dei noduli poco prima della prova etc.) e con una attenta calibratura di acetilene ridotto verso azoto fissato per ciascuna combinazione varietà/ceppo di rizobio (Herridge, 1988). Inoltre, le fluttuazioni giornaliere e stagionali di attività di riduzione dell'acetilene devono essere valutate conducendo saggi comparativi ad ore prefissate per ottenere dei fattori di conversione corretti nel corso della giornata (Herridge e Doyle, 1988). Ad esempio, Herridge (1988) ha rilevato su *Lupinus angustifolius* che il rapporto tra moli di acetilene ridotto ed azoto fissato variava da 0,9 a circa 60 giorni dalla semina (stadio vegetativo) a 6,6 a 120 giorni (stadio riproduttivo tardivo).
2. Il prelievo di tutta la massa dei noduli è indispensabile per stimare l'azotofissazione per pianta a partire dall'acetilene ridotta per grammo di nodulo. Ci sono difficoltà connesse alla tecnica di prelievo e di campionamento dei noduli (sia che le radici siano estratte, sia contenute nel terreno). Il problema è maggiore in leguminose i cui noduli sono attaccati labilmente, come nelle mediche annuali, oppure in leguminose dotate di apparato radicale più profondo (es. erba medica). La stima dell'azotofissazione può essere alterata se il campione suolo-piante non è rappresentativo della copertura vegetale. Questo può accadere in particolare in colture o prati naturali misti di leguminose e graminacee.
3. Un ulteriore svantaggio è il verificarsi di un declino dell'attività della nitrogenasi indotto proprio dall'acetilene (Witty e Minchin, 1988) che, secondo Peoples et al. (1989), rende il metodo inaccettabile per scopi di ricerca.

Discussione

Sulla base di confronti effettuati con altri metodi è risultato che il metodo ARA sottostima, in genere, l'azotofissazione (Materon, 1993).

Il metodo ARA viene descritto come rapido, poco

costoso e di elevata sensibilità, ma fornisce solo una quantificazione relativa di confronto tra diversi trattamenti e per periodi di misura limitati nel tempo. Proprio per la sua semplicità e basso costo, riscuote ancora interesse, soprattutto quando non si può disporre di metodi più costosi basati sull'uso dell'azoto marcato. Tuttavia, proprio per la sensibilità all'attività della nitrogenasi in un dato momento, il metodo ARA è usato per valutare le prestazioni di ceppi diversi di rizobi, per confrontare trattamenti relativi a tecniche di inoculazione ed in genere per studi di tipo biochimico e fisiologico in ambiente controllato. Il metodo ARA è stato invece sostituito da metodi che fanno ricorso all'azoto marcato per misure quantitative in campo. Alcuni autori (Unkovich e Pate, 2000) suggeriscono di non usare questo metodo da solo per valutazioni quantitative, ma congiuntamente ad altri metodi, al fine di valutare l'efficacia della simbiosi.

Metodi basati sull'impiego degli isotopi dell'azoto

Si conoscono numerosi isotopi dell'azoto, ma i più facili da analizzare, i radioisotopi, non sono adatti per la ricerca nei sistemi biologici perché anche il più stabile, il ^{13}N , ha un'emivita di soli 10 minuti. Per questo motivo, dovrebbe essere prodotto in prossimità del sito sperimentale e quindi il metodo non è alla portata di tutti gli sperimentatori. Tuttavia, l'uso del ^{13}N ha permesso di chiarire processi che non avrebbero potuto essere interpretati con altre tecniche.

Gli isotopi stabili dell'azoto, ^{14}N e ^{15}N , si trovano nell'atmosfera in rapporto di 272:1, corrispondente a un contenuto di ^{15}N espresso in atomi di 0,3663% (Mariotti, 1983). Il rapporto tra ^{14}N e ^{15}N si esprime convenzionalmente con l'espressione

$$R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \cong \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \quad (4)$$

Infatti la differenza tra i due rapporti è generalmente inferiore alla precisione delle apparecchiature analitiche con le quali misurare l'abbondanza naturale di ^{15}N .

L'eccesso isotopico di ^{15}N si esprime secondo la formula:

$$^{15}\text{N}\% \text{ atomi in eccesso} = ^{15}\text{N}\% \text{ atomi} - 0,3663\% \quad (5)$$

In condizioni naturali, l'azoto nel suolo è normalmente più ricco di ^{15}N e questa peculiarità viene sfruttata per misurare l'azotofissazione biologica con il metodo dell'abbondanza naturale o attraverso un ulteriore arricchimento isotopico artificiale nell'atmosfera (metodo $^{15}\text{N}_2$) o nel suolo (metodo della diluizione isotopica).

L'eccesso isotopico può anche essere espresso come $\delta^{15}\text{N}\%$, descritto dalla (14) nel capitolo sul metodo dell'abbondanza naturale.

Metodo della riduzione di $^{15}\text{N}_2$ (IR)

Da quando è divenuto disponibile, l'isotopo $^{15}\text{N}_2$, in forma gassosa, è stato utilizzato per dimostrare l'azotofissazione (Burriss e Miller, 1941). Tra tutti i metodi, è considerato il più soddisfacente per la quantificazione diretta dell'azotofissazione. Inoltre, solo attraverso questo metodo è possibile valutare molti aspetti quali-quantitativi relativi alla traslocazione e al destino dell'azoto fissato.

Assunti

Il metodo si basa sull'assunto che, in un'atmosfera arricchita con l'isotopo $^{15}\text{N}_2$, la leguminosa lo assimili in misura simile al ^{14}N .

Descrizione

L'intero sistema di fissazione, coltura batterica, suolo, pianta, radice, viene esposto ad un'atmosfera arricchita con $^{15}\text{N}_2$ per un determinato periodo di tempo, dopo il quale viene determinata la quantità di $^{15}\text{N}_2$ che è stata incorporata nella biomassa. L'analisi può riguardare l'intero sistema o le singole porzioni.

La percentuale di azoto totale derivante da azotofissazione (Ndfa) si ottiene dalla relazione:

$$\%Ndfa = \frac{\text{eccesso}^{15}\text{N} \ \% \text{atomi (campione)}}{\text{eccesso}^{15}\text{N} \ \% \text{atomi (atmosfera)}} \times 100 \quad (6)$$

Noto il contenuto di azoto totale del campione, si risale alla produzione di azoto derivante da azotofissazione.

Fonti di ^{15}N possono essere:

- $^{15}\text{N}_2$ commerciale in forma gassosa, arricchito al 50-90 o 99%, molto costoso, di difficile manipolazione e trasporto;
- produzione da sali di ammonio marcati, utili soprattutto quando sono necessari minimi quantitativi, che si ossidano a N_2 .

Se si produce $^{15}\text{N}_2$ da sali di ammonio marcati, esiste un'elevata probabilità di contaminazione del $^{15}\text{N}_2$ prodotto con N_2 atmosferico. Per questo motivo, è consigliabile procedere alla preparazione immediatamente prima della misura.

Le misure si effettuano in ambiente controllato, in contenitori con diverse caratteristiche in relazione al tipo di materiale da esaminare.

Per quanto riguarda le leguminose, si utilizzano in genere dei contenitori realizzati in modo tale da sigillare perfettamente il suolo alla base degli steli rispetto all'atmosfera circostante, pur mantenendo adeguato il rifornimento con acqua, nutrienti e ossigeno, attraverso un sistema chiuso o semichiuso.

Dettagli sulle procedure e sui calcoli da effettuare sono stati riportati da Warembourg (1993).

Punti di forza

Il metodo IR rimane il riferimento per la ricerca di base sull'azotofissazione, in quanto è l'unico che consente una stima diretta. L'azoto marcato viene incorporato dal sistema di fissazione e quindi si comporta come un vero marcatore dell'azoto fissato. Ciò consente importanti applicazioni:

- consente di verificare l'attendibilità di altri metodi indiretti per la stima dell'azotofissazione, come il metodo ARA;
- è l'unico metodo che permette di dimostrare l'esistenza di un processo di fissazione azotata in una determinata specie;
- consente di fare *screening* di ceppi batterici per l'efficienza di azotofissazione;
- consente di seguire il destino dell'azoto fissato nel sistema considerato;
- quando associato ad altre misure relative a processi correlati con l'azotofissazione, il metodo della riduzione del $^{15}\text{N}_2$ è l'unico che permette valutazioni

quantitative. Ad esempio, la marcatura contemporanea di $^{15}\text{N}_2$ e $^{14}\text{CO}_2$ ha permesso di ottenere importanti informazioni sull'economia del carbonio e dell'azoto nelle specie azotofissatrici (Warembourg et al., 1982).

Limiti di applicazione

Il principale inconveniente del metodo IR è la difficoltà tecnica di applicazione. Poiché l'intero sistema deve essere esposto ad un'atmosfera artificiale arricchita con $^{15}\text{N}_2$, è necessario disporre di sofisticate apparecchiature per il controllo dei parametri ambientali e per evitare qualsiasi contaminazione dall' N atmosferico. Soprattutto quando si lavora con grandi contenitori, indispensabili per le misure sulle piante superiori, sono sempre possibili scambi gassosi con l'atmosfera, quindi è necessario monitorare costantemente il grado di arricchimento di $^{15}\text{N}_2$ all'interno del contenitore. Per questo motivo non è possibile realizzare esperimenti con molte repliche e quindi il metodo non si presta per misure di pieno campo. Inoltre, il metodo è distruttivo e richiede complicati campionamenti ripetuti nel tempo per esperimenti di lunga durata.

Tuttavia, trattandosi di esperimenti condotti in ambiente controllato, la variabilità tra le repliche è di solito molto più ridotta rispetto a quella riscontrabile in pieno campo, quindi si può ridurre il numero di repliche.

Il metodo si presta per misurazioni di breve periodo della cinetica del processo di azotofissazione e quindi, come tale, non si presta per la quantificazione integrata su interi cicli produttivi dell'azotofissazione.

Discussione

Il metodo IR, il primo basato sull'isotopia dell'azoto (Burriss e Miller, 1941), ha permesso notevoli avanzamenti nelle conoscenze dei processi biologici dell'azotofissazione e ha ancora notevoli prospettive di applicazione con il miglioramento e la riduzione dei costi per l'accesso alle tecnologie per la determinazione dell'isotopo ^{15}N e del controllo ambientale dell'accrescimento delle piante superiori.

Metodo della diluizione isotopica (ID)

Il principio base del metodo della diluizione isotopica, applicato agli studi sull'azotofissazione, è simile a quello del metodo della riduzione del $^{15}\text{N}_2$. Differisce perché invece dell'atmosfera, si arricchisce il terreno con ^{15}N . L'azoto assorbito dal terreno sarà perciò nettamente distinguibile rispetto a quello fissato dall'atmosfera, nella quale il rapporto R è molto stabile.

Nelle specie azotofissatrici, l'entità della diluizione del ^{15}N per effetto della fissazione dell'azoto atmosferico, fornirà una misura della percentuale dell'azoto proveniente dal suolo e dall'atmosfera. Conoscendo il contenuto di azoto totale della pianta e del suolo, è possibile calcolare la quantità di azoto fissato dalla coltura per unità di superficie. Tuttavia, non è facile determinare l'arricchimento isotopico dell'azoto nel terreno concimato con ^{15}N , in quanto nessun composto chimico è idoneo a marcare uniformemente tutto l'azoto presente nel terreno e le fonti di azoto per le piante sono rappresentate da numerosi composti azotati con diverso livello di arricchimento isotopico. È necessario perciò fare alcuni

assunti e tenere conto dei limiti di applicazione del metodo, prima di poterlo applicare per le valutazioni sperimentali.

Assunti

Il metodo ID si basa sul principio che quando due fonti che differiscono per composizione isotopica vengono miscelate uniformemente, la composizione isotopica risultante riflette l'entità della differenza nella composizione iniziale di queste due fonti e i relativi quantitativi. Queste condizioni si verificano solamente nel caso di piante allevate in soluzioni in cui la fonte di N è stata marcata con ^{15}N . Per le piante allevate in normale terreno, i requisiti di una vera diluizione isotopica potranno essere verificati solamente quanto l'azoto del suolo presenta naturalmente un contenuto in ^{15}N diverso da quello atmosferico, tale da poter essere evidenziato dagli strumenti analitici (cfr. metodo NA).

L'uso di concimi arricchiti con ^{15}N , comporta per le specie azotofissatrici l'accesso a tre fonti di azoto:

- l'azoto del suolo,
- l'azoto del fertilizzante,
- l'azoto atmosferico.

Seguendo un concetto sviluppato da Fried e Dean (1953), una pianta che ha a disposizione diverse fonti di un nutriente, lo assorbirà in misura direttamente proporzionale alle quantità disponibili. Nel caso di aggiunta di azoto con un concime, la quantità di azoto disponibile può essere stimata dalla relazione:

$$A = \frac{B \cdot (1 - y)}{y} \quad (7)$$

dove:

A = quantità di nutriente disponibile nel suolo per la pianta;

B = quantità di nutriente contenuta nel fertilizzante;

y = proporzione del nutriente nella pianta che deriva dal concime.

Se il concime arricchito è la principale fonte di ^{15}N , y è la percentuale di azoto totale nelle piante che deriva dal concime (%Ndff) e A diventa:

$$A = \frac{(100 - \%Ndff)}{\%Ndff} \times \text{kg di concime N distribuito ha}^{-1} \quad (8)$$

e la proporzione di azoto totale derivante dal concime può essere stimata da:

$$\%Ndff = \frac{\text{eccesso}^{15}\text{N} \% \text{atomi (pianta)}}{\text{eccesso}^{15}\text{N} \% \text{atomi (fertilizzante)}} \times 100 \quad (9)$$

La (9) si applica anche nel caso delle specie azotofissatrici, ma la percentuale di N non derivante dal concime arricchito può derivare dal suolo e dall'atmosfera. La separazione di queste due componenti si ottiene confrontando l'azoto assimilato da una coltura azotofissatrice con quello assimilato da una coltura non azotofissatrice nel medesimo terreno arricchito con ^{15}N . La specie di riferimento serve a determinare il valore di A per l'azoto nel suolo. L'azoto della pianta azotofissatrice è dato dal valore di A per il suolo + l'azoto atmosferico fissato.

Questo approccio, che riconosce tre fonti di azoto per le piante azotofissatrici, si utilizza in alcune circo-

stanze per la stima della fissazione azotata, tuttavia la sua applicazione è problematica (Rennie e Rennie, 1983).

Assumendo che sia la leguminosa sia la specie azotofissatrice siano coltivate su un substrato con il medesimo arricchimento in ^{15}N , l'equazione si riduce alla seguente (Fried e Middleboe, 1977):

$$\%Ndfa = 1 - \frac{\text{eccesso}^{15}\text{N} \% \text{atomi (pianta Nfix)}}{\text{eccesso}^{15}\text{N} \% \text{atomi (pianta non Nfix)}} \times 100 \quad (10)$$

Questa è l'equazione normalmente impiegata per stimare l'azotofissazione in campo con il metodo ID.

Il metodo presuppone perciò l'uniforme distribuzione nel terreno del concime arricchito con ^{15}N e perciò due sole fonti di ^{15}N per la specie azotofissatrice: l'atmosfera e il terreno. Inoltre è necessario assumere che le forme di azoto assorbite dal terreno dalla leguminosa e dalla specie di riferimento abbiano lo stesso livello di arricchimento isotopico (McAuliffe et al., 1958).

Teoricamente sarebbe possibile evitare la coltura di riferimento e misurare direttamente sul terreno l'arricchimento in ^{15}N . Tuttavia, per la incerta e incontrollabile dinamica spazio-temporale dell'azoto del fertilizzante arricchito nel terreno, è molto più affidabile, e quindi consigliabile, far riferimento all'azoto assorbito da una specie di riferimento non azotofissatrice, che risponda a certe caratteristiche, come specificato più avanti (Danso et al., 1993).

Se gli assunti descritti sono soddisfatti, la modifica del metodo del valore A proposta da Fried e Middleboe (1977) è concettualmente ed analiticamente corretta e il metodo ID diventa più semplice da applicare, in quanto la stima è indipendente dalla dose di concime utilizzata e dalla produzione delle due colture.

Descrizione

Il metodo non richiede attrezzature sofisticate, a differenza di quanto previsto con il metodo IR, e consente la misura in condizioni di pieno campo. Tuttavia richiede una certa cura nella pianificazione dell'esperimento.

Per l'arricchimento con ^{15}N si possono utilizzare diversi tipi di concime arricchito: sali di ammonio (solfato, nitrato o clorato), potassio o calcio nitrato, urea, sostanza organica marcata con ^{15}N . Quest'ultima garantisce un rilascio lento e prolungato del tracciante, attenuando i problemi derivanti alla fluttuazione temporale di R nel suolo arricchito (Chalk, 1998).

L'ammonio viene in genere preferito al nitrato perché un'elevata proporzione dell'azoto marcato in forma ammoniacale viene rapidamente incorporata nel ciclo dell'azoto. Tuttavia, il nitrato permetterebbe di minimizzare le trasformazioni operate dai microrganismi. In linea teorica, bisognerebbe utilizzare azoto marcato in composti simili a quelli già presenti nel terreno. L'impiego di molecole che rilascino lentamente l'azoto marcato sono teoricamente preferibili perché permettono un più stabile livello di arricchimento nel tempo. Questo rappresenta infatti uno dei principali limiti di applicazione del metodo, come descritto più avanti. La maggior parte degli autori utilizza solfato ammonico arricchito, in quanto facilmente reperibile e di pratico impiego.

Il concime arricchito ha un costo proporzionale al livello di arricchimento. Normalmente si utilizzano materiali arricchiti con ^{15}N al 5% o al 10%.

La dose minima di impiego dipende dalla sensibilità della strumentazione analitica impiegata. Il livello di precisione raggiunto dai più aggiornati spettrometri di massa permetterebbe di azzerare la dose e di sfruttare l'abbondanza naturale di ^{15}N che caratterizza gran parte dei terreni agrari (cfr. metodo NA), ma la precisione di stima aumenta all'aumentare dell'arricchimento isotopico dell'azoto assorbito dal suolo rispetto all'azoto atmosferico. Nei suoli poveri di azoto e con specie di riferimento sensibili alle carenze di azoto, si può decidere di impiegare una dose di azoto più alta per la specie di riferimento, per la quale Danso et al. (1993) suggeriscono di non superare un rapporto 1:2.

La dose massima dipende, oltre che dal costo del fertilizzante arricchito, dal fatto che una dose troppo alta di azoto potrebbe alterare i processi di azotofissazione simbiotica. La dose ottimale è quindi quella che consente una buona precisione di stima senza influenzare negativamente l'azotofissazione. Impiegando uno spettrometro di massa, una dose di $0,1 \text{ g } ^{15}\text{N m}^{-2}$, corrispondenti a $10 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N anno}^{-1}$ arricchito al 10%, è considerata più che sufficiente ad ottenere un buon grado di precisione. Raramente si superano dosi di $20\text{-}30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ (Danso et al., 1993). Peoples et al. (1989) raccomandano dosi di N non superiori a 5 kg ha^{-1} , per non alterare significativamente il processo di azotofissazione. Per questo motivo sarebbe consigliabile utilizzare concimi ad elevata percentuale di arricchimento isotopico (es. 50%), compatibilmente con i costi. Se invece dello spettrometro ad assorbimento, si impiega lo spettrometro ad emissione, meno preciso, l'arricchimento va aumentato di un fattore 10, quindi le dosi aumentano sino a $50\text{-}100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, che possono essere ridotte in proporzione con concimi arricchiti al 30-50%. Si tratta di dosi eccessive, che interferiscono pesantemente con l'azotofissazione simbiotica.

La distribuzione del ^{15}N nel terreno deve essere effettuata con la massima uniformità possibile. Per questo generalmente il concime arricchito va diluito in acqua, preferibilmente distillata, e si distribuisce molto uniformemente nella parcella. Occorre evitare che parte del concime venga intercettato dalla copertura vegetale, determinando assimilazione diretta dalle foglie o ustioni. Per questo motivo, nel caso di colture a breve ciclo, è consigliabile concimare prima dell'emergenza, altrimenti è opportuno, dopo la somministrazione, dilavare la vegetazione irrigando con acqua senza concime. Ciò in particolare quando si trattano colture prative che, a causa del graduale impoverimento in ^{15}N nel terreno, devono essere concimate in più dosi ripetute, somministrate solitamente tra un taglio e l'altro. L'irrigazione (5-10 mm) ha anche la funzione di permettere l'approfondimento del concime marcato e quindi di ridurre le perdite per volatilizzazione dell'ammoniaca, particolarmente rilevanti in ambienti ventilati e con alte temperature. Per garantire un'uniforme distribuzione del concime marcato, è opportuno effettuare prove preliminari di distribuzione con sola acqua prima di passare alla parcella sperimentale.

Nel caso di somministrazioni su colture erbacee perenni o pascoli, si può anche mescolare il concime marcato con sabbia, riducendo così l'adesione del concime con l'apparato fogliare (Chalk e Ladha, 1999).

Queste precauzioni contribuiscono a ridurre l'eterogeneità orizzontale della disponibilità di ^{15}N ma non prevengono eventuali eterogeneità lungo il profilo verticale, per le quali sono disponibili pochi dati, che indica-

no una progressiva lisciviazione dell'azoto nitrico non immobilizzato dalla flora microbica (Chalk e Ladha, 1999).

L'epoca e la frequenza di somministrazione del concime arricchito dipendono dal tipo di coltura e dalle condizioni ambientali (Chalk, 1985). In generale, la somministrazione deve essere contemporanea per la specie di controllo e la leguminosa. In linea di principio, il rapporto R nel terreno dovrebbe rimanere costante per tutto il periodo compreso tra l'emergenza e la raccolta ed essere uniforme nel profilo verticale del suolo. Entrambe le condizioni sarebbero superabili se la dinamica dell'assorbimento dell'azoto dal suolo della leguminosa e della specie di controllo fossero sovrapponibili in termini relativi. In realtà, fatta eccezione per le isolinee non nodulanti, difficilmente disponibili per la maggior parte delle leguminose foraggere, questo assunto non è quasi mai rispettato in senso stretto. Inoltre il tasso di mineralizzazione dell'azoto potrebbe essere sostanzialmente differente nel suolo coltivato con leguminosa o con specie di controllo (Chalk e Ladha, 1999). Per questi motivi, è consigliabile utilizzare concimi a rilascio prolungato, difficili da trovare in commercio, sostanza organica arricchita con ^{15}N (es. residui di precedenti esperimenti, possibilmente con C/N poco più alto di quello del terreno, da incorporare per tempo nel terreno), impiegare inibitori della nitrificazione o somministrare piccole e frequenti dosi di concime arricchito (Danso et al., 1993). Il rischio, in assenza di queste precauzioni, è di andare incontro a imprecisioni di stima dovute alla progressiva diminuzione di R nel terreno, massima nei primi 92 giorni dopo la semina (Danso et al., 1993) che potrebbe determinare un rapporto isotopico alterato se la specie di controllo ha una dinamica temporale dell'assorbimento dell'azoto diversa da quello della leguminosa. In generale, l'impiego di sostanza organica arricchita con ^{15}N , ha fornito stime di azotofissazione più alte rispetto all'impiego di fertilizzanti minerali (Chalk, 1985).

Nelle specie annuali, che svolgono il loro ciclo nell'arco di pochi mesi e in un periodo nel quale si ha scarsa possibilità di lisciviazione dell'azoto minerale, può essere sufficiente una sola somministrazione del concime arricchito alla semina o non più tardi di una settimana dopo l'emergenza. Nelle foraggere perenni, è necessario somministrare dosi di concime ripetute, in genere dopo ogni taglio, per le determinazioni relative al taglio successivo. Alcuni autori hanno utilizzato una concimazione pre-semina, per dare tempo all'azoto somministrato di essere incorporato nella sostanza organica e quindi essere rilasciato in misura più differita nel tempo. Le applicazioni post-emergenza consentono una maggiore flessibilità in caso di problemi di emergenza o diradamenti che si rendessero necessari prima della concimazione. In questo modo è anche possibile verificare preventivamente la corrispondenza tra l'insediamento della leguminosa e della coltura di riferimento. Nel caso in cui la coltura di riferimento avesse un'emergenza ritardata o anticipata, l'epoca di semina delle due colture potrebbe essere modificata per garantire un insediamento contemporaneo, ma in ogni caso la concimazione dovrebbe essere effettuata nella stessa epoca.

In generale si raccomanda di utilizzare un disegno sperimentale a blocchi, con parcelle di dimensioni relativamente piccole e numerose ripetizioni (almeno 6), piuttosto che poche parcelle di grandi dimensioni (Broadbent et al., 1982). La coltura di riferimento va posizionata il più vicino possibile alla coltura azotofis-

satrice e il concime arricchito può essere distribuito su una subparcella più piccola della parcella intera, per ridurre i costi. Il resto della parcella viene concimato con le stesse modalità, ma utilizzando concime non arricchito.

La dimensione della subparcella dipende dal grado di fittezza della coltura e dalle modalità di semina. Con una semina a righe, per garantire il campionamento almeno su una quindicina di piante, Warembourg (1993) consiglia aree di saggio delle seguenti dimensioni: $a = 2 \times l$; $b = 7 \times p$.

Dove (misure in cm)

a = larghezza dell'area di saggio; b = lunghezza dell'area di saggio; l = distanza tra le file; p = distanza tra piante sulla fila.

L'area da concimare con ^{15}N avrà le seguenti dimensioni: $A = a + 2l$; $B = b + 6p$

Così, se $p = 10$ cm e $l = 40$ cm, l'area di saggio avrà una superficie di $0,6 \text{ m}^2$ ($0,8 \times 0,6$ m) e la superficie da concimare circa 2 m^2 ($1,6 \times 1,3$ m).

Infine, le parcelle dovrebbero essere in terreno piano, per evitare la possibilità di lisciviazione laterale.

Il metodo permette una misura dell'azotofissazione in campo indipendente dalla produzione e integrata nel tempo.

L'accuratezza e la precisione del metodo della diluizione isotopica dipende in larga misura dalla selezione della specie di controllo o specie di riferimento, per le quali sono stati definiti i principali requisiti (Danso et al., 1993; Warembourg, 1993):

- Non devono essere azotofissatrici. Eventualmente vi fossero dubbi, sarebbe opportuno fare una verifica preliminare con il metodo dell'acetilene. Vose e Victoria (1986) hanno dimostrato che molte graminacee C_4 , per esempio, supportano processi di azotofissazione associativa. In questi casi si corre il rischio di sottostimare l'azotofissazione della leguminosa, tanto più se bassa (Danso et al., 1993). In qualche caso, elevate dosi di concimazione azotata possono azzerare gli effetti dovuti all'azotofissazione associativa di alcune graminacee C_4 (Vose e Victoria, l.c.). Tuttavia, questo impedirebbe di fatto l'impiego del metodo ID, che presuppone identiche dosi di fertilizzante per la specie di controllo e per la leguminosa. Un'altra possibile verifica della capacità di azotofissazione della specie di riferimento è il confronto tra l'eccesso isotopico di isolee non nodulanti della leguminosa con quello della specie di riferimento. Se risultano simili, si può assumere che non vi sia azotofissazione associativa.
- L'apparato radicale dovrebbe esplorare approssimativamente lo stesso volume di suolo e quindi dovrebbe avere accesso alle stesse fonti di N nel suolo e dovrebbe assorbire l'azoto del suolo con un livello di arricchimento isotopico identico a quello della specie azotofissatrice. Questo aspetto è particolarmente rilevante in quanto è stato dimostrato che l'arricchimento con ^{15}N , anche se artificiale, varia nello spazio, con la profondità e può diminuire gradualmente con il tempo, per la progressiva diluizione del ^{15}N del fertilizzante dovuta alla mineralizzazione di N organico già presente nel terreno (Chalk e Ladha, 1999). Per lo stesso motivo, è fondamentale che la distribuzione di ^{15}N nel profilo del suolo sia molto uniforme. È necessario cioè che si rispetti la relazione (Danso et al., 1993):

$$\frac{\%N_{dff}(nfc)}{\%N_{dfs}(nfc)} = \frac{\%N_{dff}(fc)}{\%N_{dfs}(fc)} = R \quad (11)$$

Dove: N_{dff} = azoto dal fertilizzante arricchito; N_{dfs} = N del suolo; nfc = coltura non azotofissatrice; fc = coltura azotofissatrice; $R = \frac{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}}{^{15}\text{N}/(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})}$.

- Il livello di discriminazione isotopica nella fase di assorbimento dell'azoto nel terreno dovrebbe essere simile nelle due specie, come simile dovrebbe essere la ripartizione dell'azoto marcato tra i vari organi della pianta, in modo particolare se la determinazione riguarda piante arboree, per le quali non è possibile asportare tutta la fitomassa.
- Il modello di accrescimento della coltura di riferimento deve essere ben allineato con quello della coltura azotofissatrice, con sovrapposizione delle principali fasi fenologiche corrispondenti allo sviluppo e alla maturazione, in modo da effettuare la raccolta nella stessa epoca.
- Entrambe le colture devono avere simile sensibilità a eventuali stress ambientali, in particolare temperatura e umidità del terreno.
- Altri requisiti, quali quello che la specie di controllo dovesse essere caratterizzata da valori di A simili a quelli della leguminosa non nodulata, o quelli basati sull'efficienza d'uso dell'azoto contenuto nel fertilizzante, segnalati in passato da alcuni autori, non sono attualmente considerati validi per la infondatezza dei relativi assunti (Chalk e Ladha, 1999). È stato descritto anche un metodo basato sull'analisi della regressione per la determinazione di R nella leguminosa e nella specie di controllo, che per essere applicato correttamente richiede però un gran numero di repliche e di analisi, che di fatto ne ostacolano l'applicabilità (Chalk e Ladha, 1999). Il metodo della doppia marcatura con ^{15}N e ^{35}S per validare la specie di riferimento, indicata da Wagner e Zapata (1982), non ha trovato riscontro in successive sperimentazioni ed è stata quindi abbandonata (Chalk e Ladha, 1999). Anche l'impiego di due diverse tecniche di marcatura con ^{15}N (es. nitrato e nitrato pellettato con gesso) finalizzate a selezionare la specie di riferimento più adatta, non hanno trovato riscontro nei dati di $\%N_{dfa}$ (Witty, 1983 in Chalk e Ladha, 1999).

Per i motivi appena esposti, la scelta della specie di controllo rimane un aspetto rilevante e per certi versi critico anche con il metodo ID.

Esempi di specie di controllo possono essere non leguminose incapaci di fissare azoto o leguminose non inoculate e coltivate in terreno privo di rizobio simbiote.

Con le leguminose da granella (soia, fagiolo, fava ecc.) sono state impiegate con successo piante non inoculate in suoli privi del ceppo di rizobio specifico, oppure isolee non nodulanti, frumento, orzo, ravizzone (*Brassica napus*), sorgo.

Non essendo sempre disponibili isolee non nodulanti di leguminose foraggere, la specie di riferimento più usata come confronto è *Lolium perenne*.

Alcuni autori hanno impiegato come specie di controllo la stessa specie, non inoculata e concimata con elevate dosi di azoto minerale, che inibisce l'azotofissazione (Sanginga et al., 1990; Vose e Victoria, 1986). Tuttavia, ciò comporterebbe l'impiego di dosi di concime azotato differenziate per la coltura azotofissatrice e quella di riferimento, che viola uno degli assunti del

metodo, e non esclude la possibilità che in alcune specie l'azotofissazione non venga inibita dalla concimazione azotata (Danso et al., 1993).

La specie di controllo può essere omessa nel caso in cui l'interesse prevalente dello sperimentatore sia la quantificazione relativa dell'azotofissazione, per esempio di diverse linee di rizobio, o quando si può assumere che la distribuzione spazio-temporale del ^{15}N nel terreno sia perfettamente uniforme. Tuttavia, in assenza di specie di riferimento, non è possibile quantificare in valore assoluto l'azotofissazione simbiotica con il metodo ID.

Un'altra possibile alternativa all'uso della specie di riferimento è quella di utilizzare un approccio modellistico (Chalk e Ladha, 1999; Reiter et al., 2002), per attenuare gli effetti negativi derivanti dalla irregolare distribuzione spazio-temporale del ^{15}N nel suolo. Per poter applicare correttamente i modelli, è necessario disporre di risultati di campionamenti ed analisi del ^{15}N nel suolo a diverse profondità ed è necessario prestare particolare attenzione all'aspetto analitico, nettamente più critico nel caso del suolo rispetto a quello dei vegetali, per l'interferenza determinata dall' N inorganico proveniente da fonti esterne (Chalk e Ladha, 1999).

Il campionamento della fitomassa epigea non richiede particolari attenzioni rispetto a quanto normalmente previsto. La raccolta va fatta contemporaneamente per la leguminosa e la specie di controllo (Fried et al., 1983). Nel caso di confronti varietali tra leguminose caratterizzate da diversa precocità, il confronto va fatto utilizzando più specie di controllo caratterizzate da diversa precocità, per aumentare la probabilità di avere una coltura di riferimento appropriata per le colture azotofissatrici raccolte in epoche diverse (Danso et al., 1993).

In genere si separano accuratamente le principali componenti della fitomassa epigea e talvolta si preleva anche la fitomassa ipogea attraverso appositi carotaggi, come specificato più avanti.

I dati acquisibili con il campionamento descritto sono i seguenti:

- Produzione delle diverse porzioni di fitomassa epigea ed ipogea (es. legumi, steli, foglie, corone, radici, noduli).
- Contenuto in azoto delle diverse porzioni di fitomassa.
- ^{15}N %atomi di ciascuna porzione di fitomassa, per le piante azotofissatrici e di controllo.

Il calcolo della proporzione di N totale derivante da azotofissazione si effettua con la (9).

Per una maggiore precisione di stima, sarebbe necessario conoscere l'eccesso isotopico per entrambe le specie (controllo e azotofissatrice) coltivate in un ambiente privo di ^{15}N . Tuttavia, si considera valido come valore di riferimento il contenuto di ^{15}N nell'aria (0,3663% atomi), per cui l'eccesso isotopico si calcola con la (5).

L'eccesso di ^{15}N nella fitomassa dovrebbe essere ottenuto attraverso una media dell'eccesso isotopico misurato nei singoli organi ponderato per la ripartizione in peso della fitomassa tra i vari organi.

Nota la %Ndfa, si può calcolare la quantità di azoto fissato per unità di superficie:

$$\text{N}_2 \text{ fissato (kg ha}^{-1}\text{)} = \frac{\%Ndfa \times N_{tot} \text{ legum kg ha}^{-1}}{100} \quad (12)$$

È stato dimostrato che i diversi organi della pianta possono essere caratterizzati da diverso grado di arricchimento isotopico. Per questo, in alcuni casi, sarebbe opportuno campionarli ed analizzarli separatamente, al fine di migliorare la precisione di stima. In alternativa, al fine di ridurre i costi per le analisi, si potrebbe propendere per un'analisi preliminare del grado di arricchimento isotopico dei diversi organi della stessa pianta, per poi decidere se analizzarli separatamente, in particolare per le leguminose da granella. Il discorso vale in particolare nel caso di specie arboree, per le quali è in genere improponibile il campionamento distruttivo. Le problematiche relative sono state affrontate in dettaglio da Danso et al. (1993).

Il trattamento dei campioni, una volta separate le varie frazioni di fitomassa e misurato il peso dopo essiccazione a 70°C , prevede la macinazione e conservazione per l'analisi del contenuto in ^{15}N . Quando possibile, il materiale con minor tenore di ^{15}N (es. quello di leguminose) dovrebbe essere trattato per primo, per evitare o almeno minimizzare la contaminazione delle apparecchiature con residui ad alto tenore di ^{15}N , che possono alterare l'analisi relativa ai campioni successivi. Per questo motivo, per esempio, il mulino va sempre accuratamente pulito tra un campione e il successivo.

Per la quantificazione della produzione di sostanza secca e di altre eventuali variabili collaterali, ritenute utili per l'obiettivo della ricerca, è consigliabile raccogliere campioni di più grandi dimensioni nell'area non marcata.

Una variante del metodo ID è quello basato sull'impiego di materiale impoverito di ^{15}N per marcare l'azoto nel suolo, in modo tale da rendere l' N del suolo meno ricco in ^{15}N rispetto all'azoto derivante dalla fissazione atmosferica. Il metodo è basato sugli stessi principi e ha gli stessi limiti del metodo ID, oltre al fatto di richiedere un'elevatissima precisione di misura del ^{15}N . L'unico vantaggio rispetto al metodo ID è il fatto che non da luogo a contaminazioni delle attrezzature con ^{15}N .

Nel caso di miscugli, la specie di riferimento può essere la specie consociata non azotofissatrice, sempre che sia possibile assumere che non c'è un trasferimento dell'azoto fissato dalla leguminosa alla consociata. Ciò vale anche per eventuali specie infestanti non azotofissatrici, che vengono spesso utilizzate come riferimento (Shah et al., 2003). Da questo punto di vista, Danso et al. (1993) riassumono i contrastanti risultati ottenuti da diversi autori e suggeriscono di considerare valido l'assunto di assenza di trasferimento dalla leguminosa alla specie consociata se l'eccesso isotopico della coltura di riferimento non varia se coltivata in miscuglio o in purezza. Su questa base, Hardarson et al. (1988) suggeriscono di calcolare il trasferimento alla specie non azotofissatrice di azoto fissato dalla leguminosa ($N_{\text{fix} \rightarrow \text{ctrl}}$) con la formula:

$$N_{\text{fix} \rightarrow \text{ctrl}} = 1 - \frac{\%^{15}\text{N}_{\text{ecccMIX}}}{\%^{15}\text{N}_{\text{ecccPUR}}} \quad (13)$$

Dove $\%^{15}\text{N}_{\text{eccc}}$ è l'eccesso isotopico della coltura di riferimento coltivata in miscuglio (MIX) o in purezza (PUR).

Tuttavia, non è detto che la stessa coltura di riferimento assorba N allo stesso modo quando coltivata in miscuglio o in purezza. Anche in questo caso, pur non essendo soddisfatto l'assunto del mancato trasferimento di azoto fissato dall'atmosfera alla leguminosa alla col-

tura di riferimento, la precisione di stima è comunque accettabile quando l'azotofissazione della leguminosa è alta (Hardarson et al., 1988).

Punti di forza

Se si garantisce un buon livello di accuratezza nell'esecuzione degli esperimenti, il metodo della diluizione isotopica unisce ottima affidabilità e semplicità di esecuzione per misure dell'azotofissazione in condizioni di pieno campo.

L'effetto della specie di controllo non va sopravvalutato. L'errore ad essa legato è infatti tanto minore quanto maggiore la proporzione di azoto proveniente da fissazione simbiotica nella leguminosa e quindi quanto maggiore la differenza di arricchimento isotopico tra leguminosa e coltura di controllo. In particolare, quando %Ndfa è inferiore al 60% (es. leguminose raccolte troppo precocemente) l'errore di stima può diventare inaccettabile (Chalk e Ladha, 1999), mentre è in genere trascurabile con %Ndfa superiori all'80% (Danso et al., 1993; Hardarson et al., 1988).

Il metodo ID comporta un'alterazione del rapporto isotopico dell'azoto nel suolo che in genere si prolunga ben oltre il periodo di sperimentazione. Il ^{15}N somministrato in forma minerale viene per lo più incorporato in sostanze organiche di diversa natura e mineralizzato lentamente nei mesi successivi. Questo permetterebbe di utilizzare le parcelle di terreno arricchite per esperimenti in anni successivi senza ulteriori aggiunte di ^{15}N , se le dosi impiegate e le porzioni di terreno arricchite sono sufficienti. Da questo punto di vista, i terreni pesanti, caratterizzati da scarsa probabilità di lisciviazione ed elevata attività microbica, sono più adatti (Danso et al., 1993; Fried et al., 1983).

Il metodo può essere impiegato anche per stime dell'azotofissazione associata delle graminacee, se è disponibile una coltura di riferimento.

Il metodo ID ha anche il vantaggio di rendere possibile la valutazione della ripartizione dell'azoto fissato tra i vari organi della pianta. Nel caso si utilizzi come confronto una leguminosa non nodulata, è possibile dimostrare anche se esiste un destino diverso dell'azoto fissato rispetto a quello assorbito dal terreno.

Limiti di applicazione

Una delle principali limitazioni è rappresentata dalla possibile violazione degli assunti sulla uniforme arricchimento isotopico del suolo nello spazio (orizzontale e verticale) e nel tempo, soprattutto se la specie di controllo non risponde ai requisiti già descritti. Le deviazioni attese per effetto di questo fattore sono molto rilevanti con %Ndfa relativamente basse, potendo superare il 50% (Reiter et al., 2002).

Una seconda limitazione è rappresentata dalla difficoltà di individuare a priori una specie di controllo che abbia un modello di accrescimento e di assorbimento dell'azoto simile a quello della leguminosa, non solo per quantità ma anche per proporzione di ^{15}N (Danso et al., 1993). Il problema è più rilevante con le specie perenni. Tuttavia, nell'ambito del progetto "PRIN Azotofissazione", il metodo è stato impiegato senza particolari limitazioni anche in colture prative, come l'erba medica, caratterizzate da ciclo produttivo pluriennale.

La specie di controllo è ancora considerata il "tallone d'Achille" del metodo ID (Chalk e Ladha, 1999) e lascia un certo margine di incertezza nella quantificazione in campo dell'azotofissazione con questo metodo.

Discussione

Tra le opzioni proposte da numerosi autori per attenuare questo problema, considerando la specificità di sito ed epoca nella risposta della stessa specie di controllo, la più razionale e prudente potrebbe essere quella di utilizzare più specie di controllo per ogni esperimento, in modo da posticipare la validazione al dopo raccolta, in relazione ai risultati ottenuti. Tuttavia questi risultati non saranno necessariamente validi in altri siti sperimentali od epoche, salvo situazioni nelle quali si possa assumere l'uniforme distribuzione spazio temporale dell'arricchimento isotopico (Chalk e Ladha, 1999). Per questo motivo, può essere utile rilevare la dinamica temporale di assorbimento dell'azoto delle specie di controllo per valutare se è simile, in termini relativi, a quella della leguminosa, in particolare nelle prime fasi di sviluppo, che incidono maggiormente sull'errore di stima finale, in particolare a bassi livelli di %Ndfa (Witty, 1983).

Un possibile sviluppo della metodologia riguarda l'impiego della modellistica applicata alla dinamica del ^{15}N in estratti di suolo, di cui si è già accennato precedentemente (Chalk e Ladha, 1999).

Un'alternativa potrebbe essere quella di impiegare il metodo del valore A, con il quale è possibile distribuire dosi di concime differenziate per la specie azotofissatrice e di controllo. Tuttavia la stima con questo metodo è fortemente dipendente dalla produzione e non sempre si verifica l'assunto per cui la disponibilità di azoto (il valore A) del suolo non marcato non cambia all'aumentare della dose di concimazione azotata. Per questi ed altri limiti, il metodo del valore A è stato soppiantato dal metodo ID.

Recentemente, Reiter et al. (2002) hanno proposto un metodo basato sull'impiego di dosi di ^{15}N minime (dell'ordine di poche decine di g ha^{-1} di N distribuiti con grandi volumi d'acqua), da definirsi in funzione (a) dell'accuratezza degli strumenti analitici per la misura del ^{15}N , (b) dell'arricchimento isotopico naturale e (c) della quantità dell'azoto minerale disponibile per la pianta nel suolo. La procedura descritta, utile in particolare dove l'arricchimento isotopico naturale è insufficiente a garantire una sufficiente precisione, ha il vantaggio di permettere applicazioni su ampia scala con minima interferenza sulla dinamica del ciclo dell'azoto e bassi costi. Gli stessi autori propongono di attenuare i problemi relativi alla distribuzione uniforme del ^{15}N nel suolo attraverso un modello matematico di simula la dinamica dell'azoto minerale e del ^{15}N nel terreno.

Altri limiti del metodo ID, quali l'interferenza dell'N del concime con l'azotofissazione e la possibile contaminazione delle apparecchiature per la preparazione e l'analisi dei campioni, sono già stati illustrati.

Metodo dell'abbondanza naturale (NA)

Assunti e descrizione

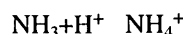
Il metodo NA si basa sugli stessi principi del metodo ID, sfruttando la caratteristica delle leguminose di assimilare azoto minerale dal terreno e dall'atmosfera e l'arricchimento isotopico naturale che caratterizza gran parte dei terreni.

L'unità di misura utilizzata per esprimere l'abbondanza naturale di ^{15}N è il $\delta^{15}\text{N}\%$, che rappresenta un indice della proporzione di ^{15}N sul totale rispetto all' N_2 atmosferico.

$$\delta^{15}N(\%) = \frac{^{15}N\%_{\text{atom campione}} - ^{15}N\%_{\text{atom aria}}}{^{15}N\%_{\text{atom aria}}} \times 1000 \quad (14)$$

dove: %¹⁵N si ottiene dalla (4) (Shearer & Kohl, 1993). Questa trasformazione è utile per evidenziare anche piccole differenze di contenuto di ¹⁵N, che normalmente oscilla tra 0,36300 e 0,37009% atomi.

Il δ¹⁵N dell'atmosfera è per definizione pari a 0, mentre nel terreno questo valore varia, mantenendosi in genere superiore a zero. Una delle ragioni dell'abbondanza naturale di ¹⁵N nel terreno è legata al fatto che le forme di N contenenti i due isotopi ¹⁴N e ¹⁵N non hanno la stessa velocità di reazione negli equilibri chimici. Ad esempio, nell'equilibrio:



il ¹⁵N nell'ammoniaca (NH₃) è inferiore a quello in NH₄⁺ del 20‰. Poiché NH₃ è volatile, l'ammonio nel terreno tende ad essere naturalmente più ricco di ¹⁵N rispetto a N₂ (Shearer e Kohl, 1993).

Nelle specie azotofissatrici, la %¹⁵N nella fitomassa riflette la quantità di azoto assorbito dal terreno e dall'atmosfera; nelle specie non azotofissatrici, in assenza di azotofissazione non simbiotica, la proporzione di ¹⁵N nella fitomassa tende ad essere più simile a quella dell'azoto nel terreno, ma può essere alterata da processi di discriminazione isotopica nelle fasi di assorbimento, assimilazione e traslocazione dell'azoto minerale del terreno (Shearer e Kohl, 1993).

Sfruttando l'abbondanza naturale di ¹⁵N nel terreno, è possibile stimare l'azotofissazione senza dovere utilizzare i fertilizzanti arricchiti, come avviene per il metodo ID. La determinazione dell'arricchimento naturale in ¹⁵N nella fitomassa di una specie non azotofissatrice coltivata nello stesso suolo della leguminosa, può essere sufficiente a valutare l'arricchimento isotopico dell'azoto assorbito dal suolo e quindi indirettamente a stimare la %Ndfa della leguminosa.

Il calcolo della percentuale dell'azoto totale della fitomassa assimilata dall'atmosfera (%Ndfa), sfruttando l'abbondanza naturale è la seguente:

$$\text{Ndfa}(\%) = \frac{\delta^{15}N\%_{\text{specie di controllo}} - \delta^{15}N\%_{\text{specie azotofissatrice}}}{\delta^{15}N\%_{\text{specie di controllo}} - B} \times 100 \quad (15)$$

Il termine *specie di controllo* (o di riferimento) ha lo stesso significato illustrato a proposito dei metodi NB e ID. Il termine *B* si riferisce invece al δ¹⁵N di una leguminosa nodulata, coltivata su un substrato privo di N minerale e deve perciò essere determinato sperimentalmente (Tab. 1). La determinazione del B deve essere perciò effettuata in ambiente controllato. Shearer e Kohl (1993) suggeriscono di effettuare la misura su piante coltivate in coltura idroponica con una soluzione priva di azoto e di prelevare i campioni da analizzare in uno stadio fenologico nel quale sia trascurabile il contributo dell'azoto contenuto nel seme rispetto all'azoto totale della pianta. Gli stessi autori ritengono utile misurare B separatamente per i diversi organi della pianta e di ottenere il B medio dalla media ponderata di questi valori. Il valore B ha la funzione di correggere eventuali discriminazioni isotopiche che possono verificarsi all'interno della pianta nelle fasi di assorbimento e ripartizione dell'azoto fissato (Unkovich et al., 1994).

Per poter applicare il metodo NA è necessario che la

Tabella 1 - Valori di B riscontrati in letteratura per alcune leguminose.

Table 1 - B values reported by different authors for some legumes.

Leguminosa	δ ¹⁵ N (‰)		Riferimento bibliografico
	fitomassa epigea	radici nodulate	
<i>Cicer arietinum</i>	-1,34		Unkovich e Pate, 1999
<i>Lupinus luteus</i>	-0,88		
<i>Lens culinaris</i>	-0,51		
<i>Medicago polymorpha</i>	0,02		
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	-0,48	-0,53	Unkovich et al., 2000
<i>Trifolium subterraneum</i>	-1,13		
<i>Glicine max</i>	-1,30		Peoples et al., 1989
<i>Trifolium subterraneum</i>	- 0,7	1,8	Unkovich e Pate, 1994
<i>Trifolium arvense</i>	- 0,3	0,8	
<i>Trifolium balansae</i>	- 0,3	1,6	
<i>Trifolium campestre</i>	- 0,6	0,1	
<i>Trifolium fragiferum</i>	- 0,4	1,0	
<i>Lupinus angustifolius</i>	- 0,2	2,0	
<i>Pisum sativum</i>	- 0,3	1,7	
<i>Hedysarum coronarium</i>	0,3	1,2	Ballatore, 2000 Eusebi et al., 2003
	- 2,4*		

* Determinazione indiretta.

proporzione di ¹⁵N nell'azoto minerale del suolo sia nettamente distinta da quella dell'¹⁵N₂ atmosferico, cioè che il δ¹⁵N nel suolo sia superiore a 0‰. Maggiore sarà questa differenza, maggiore sarà la precisione della misurazione (Fig. 1). Se la sensibilità richiesta per la stima dell'azotofissazione deve essere contenuta entro ±10% Ndfa, il δ¹⁵N dell'azoto minerale del suolo, che dovrebbe corrispondere a quello della specie di riferimento, dovrà essere almeno 10 volte la precisione analitica della misurazione di ¹⁵N effettuata con lo spettrometro di massa. Per esempio, posta la precisione analitica dello spettrometro di massa pari a ± 0,5‰ e B=0, un suolo con un arricchimento isotopico pari al 5‰ sarebbe idoneo

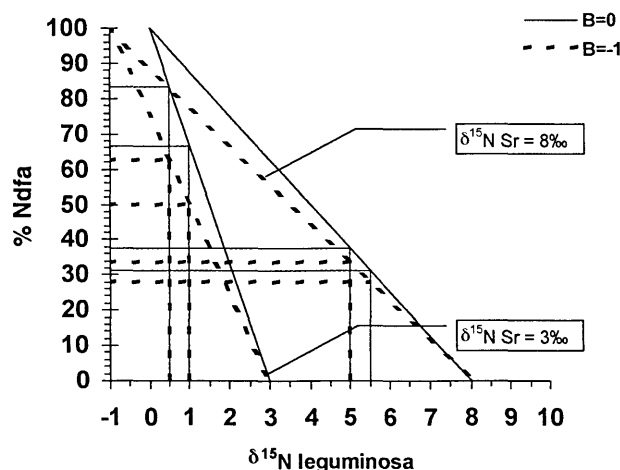


Figura 1 - Relazione tra δ¹⁵N della leguminosa e %Ndfa, in funzione del δ¹⁵N della specie di riferimento (Sr) e del valore di B della leguminosa. Il grafico evidenzia come varia la sensibilità di stima della %Ndfa per uno scostamento dello 0,5‰ del δ¹⁵N della leguminosa per due valori di δ¹⁵N (3 e 8 ‰) della specie di riferimento e due valori di B della leguminosa (0 e -1‰). Modificata da Unkovich et al. (1994).

Figure 1 - Relationship between legume δ¹⁵N and %Ndfa for two different δ¹⁵N values of the reference species (Sr) and two different B values of the legume. The scheme illustrate how the precision of the estimate of %Ndfa decreases as δ¹⁵N values of the reference species increases and for a legume δ¹⁵N change of 0.5‰ at the two (Modified from Unkovich et al., 1994).

per determinare la %Ndfa con una precisione del 10% (4,5 = 5,0-0,5).

$$\%Ndfa = \frac{5,0 - 4,5}{5,0} \times 100 = 10\%$$

Unkovich et al. (1996) hanno riscontrato valori di $\delta^{15}\text{N}$ dell'azoto minerale del suolo sufficienti ad applicare il metodo NA in molte aree dell'Australia. Eusebi et al. (2003) hanno verificato positivamente $\delta^{15}\text{N}$ sufficienti in un sito sperimentale della collina marchigiana.

Prima di avviare una sperimentazione con il metodo NA è dunque opportuno verificare che il sito sperimentale risponda ai requisiti necessari per l'applicazione con una precisione accettabile. Poiché l'effetto isotopico associato con la fissazione di N_2 di solito altera l'abbondanza di ^{15}N del N_2 atmosferico di non più del 2‰, e più spesso ancor meno, si potrebbe assumere inizialmente che il sito risponde ai requisiti necessari per l'applicazione del metodo NA se l'abbondanza di ^{15}N nell'azoto minerale del suolo disponibile per l'assorbimento delle piante è significativamente differente da quella dell' N_2 atmosferico. È però consigliabile misurare il $\delta^{15}\text{N}$ del suolo attraverso la misura dell'abbondanza di ^{15}N nei tessuti di piante non azotofissatrici. In questo modo, infatti, si tiene conto della discriminazione isotopica che caratterizza i processi di assorbimento e assimilazione e dell'azoto effettivamente disponibile per la pianta, integrato nello spazio e nel tempo in relazione alla distribuzione e sviluppo dell'apparato radicale (Shearer e Kohl, 1993). Gli stessi autori suggeriscono di prendere in considerazione più specie di controllo, soprattutto se si riscontrano differenze significative di $\delta^{15}\text{N}$, che possono essere influenzate dal sito sperimentale e/o dall'epoca di campionamento.

Per quanto riguarda i tessuti da campionare, valgono le considerazioni fatte per il metodo ID. È consigliabile effettuare la misura del $\delta^{15}\text{N}$ separatamente per i diversi organi, soprattutto se esso risulta significativamente influenzato dal tipo di tessuto, dal momento che la proporzione di foglie e steli in una stessa pianta può variare sostanzialmente con la fenologia. È inoltre opportuno evitare di campionare tessuti molto giovani, che in alcune specie sono ricchi di nitrati, e quindi con $\delta^{15}\text{N}$ alterato rispetto ai tessuti maturi (Shearer e Kohl, 1993). Per questo motivo gli stessi autori, ai quali si rimanda per ulteriori dettagli metodologici, suggeriscono di impiegare specie di controllo caratterizzate da una scarsa variazione del $\delta^{15}\text{N}$ nei diversi tessuti.

Punti di forza

Utilizzando questa metodologia di stima della %Ndfa, si aggiungono ai vantaggi descritti per il metodo ID, il risparmio sui costi del fertilizzante marcato e la possibilità di impiegare il metodo in aree naturali, nelle quali altri metodi sono praticamente inattuabili (Unkovich e Pate, 2000; Shearer e Kohl, 1993). Essendo infatti basato sulla determinazione del $\delta^{15}\text{N}$ nella leguminosa e nella specie di controllo, la quantificazione dell'azotofissazione con il metodo NA dipende in minima parte dalle fluttuazioni produttive della coltura nel corso dell'esperimento, al contrario di quanto avviene con il metodo NB. Rispetto al metodo ID, il metodo NA è meno sensibile alle variazioni del rapporto R, non essendo questo alterato dalla somministrazione di concime marcato (Danso et al., 1993).

Limiti di applicazione

I principali limiti di applicazione del metodo sono stati descritti da Shearer e Kohl (1993) e Chalk e Ladha (1999); in Italia da Eusebi et al. (2003) e Ballatore (2001). In particolare, Shearer e Kohl (1993) illustrano le critiche di numerosi autori in merito alla variabilità spatio-temporale del $\delta^{15}\text{N}$ e alla notevole influenza della discriminazione isotopica specifica di ogni specie, talvolta di singoli organi e stadi fenologici, determinata dalla piccola abbondanza naturale di ^{15}N nel sistema suolo rispetto all'atmosfera. Essi concludono la loro analisi dicendo che poiché nessuno dei metodi convenzionalmente utilizzati, incluso il metodo ID, permette di fatto un errore di stima inferiore al metodo NA, tipicamente pari a 5-10%, il metodo NA è considerato complessivamente un approccio utile, per misure "semi-quantitative", la cui applicazione va comunque valutata in relazione alle caratteristiche del sistema oggetto di studio.

Di seguito si illustra una sintesi dei limiti di applicazione del metodo, basate sulle considerazioni degli autori sopra citati.

- L'esigenza di verificare preliminarmente la rispondenza del sito sperimentale ai requisiti necessari per la sua applicazione.
- La possibilità che il $\delta^{15}\text{N}$ nel suolo vari significativamente con la profondità e quindi che la precisione di stima venga inficiata da una diversa distribuzione dell'apparato radicale della specie di controllo rispetto alla leguminosa. La specie di riferimento dovrebbe perciò presentare un apparato radicale con caratteristiche, soprattutto in termini di assorbimento selettivo del ^{15}N minerale del terreno, simili a quelle della leguminosa.
- Le possibili variazioni stagionali del $\delta^{15}\text{N}$ nei tessuti della specie di controllo, non legate a corrispondenti variazioni nel terreno e/o nella leguminosa.
- La variazione della discriminazione isotopica in fase di assorbimento dal suolo e assimilazione di diverse forme di N, caratterizzate da differenti $\delta^{15}\text{N}$.
- La variazione temporale della discriminazione isotopica durante la fissazione biologica dell'azoto dall'atmosfera da parte della specie azotofissatrice, valutabile sperimentalmente attraverso la (non agevole) misura del valore B in coltivazioni su substrati privi di N in forma combinata, di cui non sono disponibili sufficienti e affidabili riferimenti per molte specie. Dati ottenuti da Unkovich et al (2000) e da Ballatore (2001) hanno messo in evidenza gradienti di $\delta^{15}\text{N}$ nei diversi organi della stessa leguminosa, ai quali non è stata ancora data un'interpretazione soddisfacente: parte epigea < parte ipogea < noduli radicali. Da qui l'importanza, sottolineata da varia autori (Unkovich et al., 2000; Eusebi et al., 2003) di sviluppare specifiche sperimentazioni per la determinazione del B, la cui rilevanza è inversamente proporzionale alla differenza tra $\delta^{15}\text{N}$ della specie di riferimento rispetto a quello della leguminosa (Fig. 1).
- La determinazione e la comprensione del grado di frazionamento isotopico presente nei diversi organi della pianta, necessario nel caso in cui la misura del $\delta^{15}\text{N}$ venisse effettuata solo su alcuni organi.

Il metodo dell'ureide

Assunti

Il metodo dell'ureide, noto anche come analisi dei soluti azotati, si basa sulla capacità di molte specie legu-

minose tropicali di convertire l'NH₃ fissata dall'atmosfera in ureide, allantoina ed acido allantico. Questo processo chimico avviene all'interno dei noduli radicali da dove, in seguito, i suddetti composti azotati sono trasferiti all'apparato epigeo attraverso la linfa xilematica (Herridge e Peoples, 1990). Al contrario, l'azoto minerale del terreno, assorbito principalmente come NO₃⁻, può essere trasportato tal quale nella parte epigea oppure essere trasformato nelle radici in α-amminoacidi (asparagina e glutamina), prima della sua traslocazione verso la parte epigea. Ciò significa che la determinazione delle concentrazioni molarie dei suddetti composti è in grado garantire un'adeguata informazione sull'efficienza del processo simbiotico e di azotofissazione.

Se nel suolo sono presenti elevate concentrazioni di azoto minerale, all'interno della pianta verranno rilevate una maggiore presenza di NO₃⁻ od α-amminoacidi rispetto ai composti ureidici. In queste condizioni, infatti, la leguminosa assorbirà prevalentemente l'azoto prontamente disponibile nel suolo rispetto a quello atmosferico. Di conseguenza, la stima della concentrazione dei composti ureidici della leguminosa allo studio, consente di determinare l'abbondanza relativa dell'ureide-N (%RUN), necessaria per la stima della %Ndfa.

Descrizione

La procedura per la quantificazione dell'azotofissazione richiede la determinazione delle concentrazioni dei composti azotati (ureidici e nitrati) attraverso la seguente procedura:

- 1) raccolta, in pieno campo, della biomassa epigea ed ipogea di un numero adeguato di piante (10-15) per parcella;
- 2) estrazione del mezzo su cui effettuare le analisi per la determinazione della concentrazione dei vari composti azotati, che può avvenire attraverso:
 - a) prelievo della linfa xilematica che naturalmente trasuda dalle radici o dalle piante tagliate;
 - b) prelievo della linfa xilematica estratta attraverso una pompa da vuoto (Herridge, 1984; Peoples et al., 1989);
 - c) estratto di 500 mg di materiale macinato e mantenuto a bagnomaria per 3 min in 20 ml di acqua distillata;
- 3) molitura dei campioni di materiale vegetale raccolti in pieno campo (previa essiccazione ad 80 °C per 48 ore) per la determinazione della % N con il metodo Kjeldhal;
- 4) determinazione dei nitrati attraverso la *tecnica di iniezione del flusso*, che prevede l'utilizzazione di una colonna di scambiatore anionico in grado di catturare i nitrati stessi e quindi rilasciarli nel *trasportatore di correnti anioniche e cationiche* di un cromatografo, in grado di leggerne le loro concentrazioni (Herridge e People, 2002);

- 5) determinazione della concentrazione ureidica attraverso la tecnica colorimetrica descritta da Peoples et al. (1989).

Una volta determinate le concentrazioni molarie dei suddetti composti azotati è possibile calcolare l'abbondanza relativa dell'ureide-N (RUN) attraverso la seguente formula:

$$RUN = 400 a / (4a + b + c) \quad (16)$$

Dove a, b, c, sono, rispettivamente le concentrazioni molarie delle ureidi, dei nitrati, e degli α-amminoacidi (Herridge, 1984).

La concentrazione dell'ureide è stata moltiplicata per 4 considerando che in ogni molecola sono presenti 4 atomi di N (Herridge et al., 1984). Attraverso opportune sperimentazioni in serra condotte da Herridge e Peoples (1990, 2002), con livelli controllati di NO₃⁻, sono state determinate le formule per il calcolo della %Ndfa, dove le regressioni tra la RUN presente nella linfa xilematica o negli estratti delle leguminose allo studio e la %Ndfa sono risultate sufficientemente affidabili (Tab. 2).

Punti di forza

I principali vantaggi di questo metodo sono:

- La raccolta del mezzo (linfa xilematica od estratto del materiale vegetale) su cui effettuare l'analisi è molto semplice.
- L'analisi dei composti azotati (ureidi, α-amminoacidi, e nitrati) non richiede attrezzature sofisticate.
- Non richiede il campionamento di specie di riferimento non-simbiotiche.

Limiti di applicazione

Il principale limite di applicazione del metodo dell'ureide è che si può utilizzare solo per le leguminose, in genere di origine tropicale, che hanno la capacità di convertire selettivamente l'azoto fissato dall'atmosfera in ureide. Inoltre, il metodo fornisce una stima della %Ndfa circostanziata ad un determinato stadio fenologico della specie azotofissatrice e la stima può essere influenzata dalle condizioni climatiche.

Discussione

È noto che una delle informazioni più utili, negli studi concernenti il processo di azotofissazione, è quella relativa a percentuali e quantità di azoto fissato in grado di rappresentare l'intero ciclo biologico della leguminosa (ad esempio utilizzando i metodi basati sull'isotopia). Tutto ciò, per le ragioni sopra esposte, ha certamente limitato il diffondersi del metodo dell'ureide essendo necessario, con quest'ultima, effettuare più campionamenti nel corso delle varie fasi fenologiche della leguminosa.

Studi condotti da Song et al. (1995), su 9 genotipi di soia e da Herridge e Rose (2000) su 13 genotipi della

Tabella 2 - Equazioni di regressione tra il contenuto di azoto ureidico e la %Ndfa in funzione della specie e dello stadio fenologico (modificato da Herridge e Peoples, 1990; 2001).

Table 2 - Regression equations between Ureide-N and %Ndfa in relation to the species and the phenological stage (modified from Herridge and Peoples, 1990; 2002)

Specie	Equazione	r ²	Stadio fenologico
<i>Glicine max</i>	% Ndfa = 1,56 (RUN - 7,7)	0,94	fioritura
	% Ndfa = 1,56 (RUN - 15,9)	0,94	riempim. baccelli
<i>Vigna unguiculata</i>	% Ndfa = 3,22 (RUN - 7,2)	0,89	tutti
<i>Vigna radiata V. mungo</i>	% Ndfa = 2,04 (RUN - 11,7)	0,90	tutti

stessa coltura, hanno evidenziato che le concentrazioni di ureide, nel periodo di riempimento dei baccelli, erano altamente correlate con i $\delta^{15}\text{N}$ degli stessi genotipi (coefficienti di correlazione pari rispettivamente a 0,81 e 0,93). Sfortunatamente le specie di riferimento, in ambedue gli studi, non vennero raccolte, rendendo quindi impossibile un confronto tra la % Ndfa misurata con il metodo dell'ureide e quella misurata con il metodo dell'isotopia naturale. Questa lacuna è stata colmata in un recente studio di Herridge e Peoples (2002) il cui obiettivo è stato quello di determinare se l'azotofissazione di quattro leguminose tropicali (*Glicine max*, *Vigna unguolata*, *V. radiata*, *V. mungo*), potesse essere quantificata attraverso un unico campionamento della loro linfa xilematica. I dati presentati nello studio provengono anche da una precedente sperimentazione condotta su 6 genotipi di soia (*G. max*) seminati in cinque differenti località (Herridge e Peoples, 1990). L'analisi della regressione indica in questo caso che il periodo di sviluppo corrispondente a quello dello stadio iniziale di riempimento del baccello è in grado di fornire dei valori di %Ndfa, calcolati con il metodo dell'ureide, ben correlati ($r^2=0,84$) con la %Ndfa dell'intero ciclo biologico, calcolata con la tecnica dell'isotopia naturale allo stadio finale di riempimento del baccello.

Per ottenere un soddisfacente livello di precisione, i trattamenti allo studio devono essere sufficientemente replicati, ed ogni rilievo effettuato sulla linfa xilematica o sull'estratto di materiale vegetale, deve essere effettuato su un numero di piante non inferiore a 10-15.

Il livello di accuratezza e di precisione della stima della %Ndfa, nel caso si decidesse di effettuare un solo rilievo, dipende dallo stadio fenologico della leguminosa. I valori di RUN (%) e di %Ndfa della soia, per esempio, sono aumentati congiuntamente in tutte le fasi fenologiche, evidenziando, negli stadi di inizio e di fine fioritura, valori inferiori a quelli degli stadi successivi. Tuttavia, le altre tre specie (*V. unguolata*, *V. radiata*, *V. mungo*) hanno mostrato una correlazione meno evidente tra i valori di RUN (%) e di %Ndfa, soprattutto nelle fasi di stadio intermedio e finale di riempimento dei baccelli. Ciò ha fatto ipotizzare che questi risultati possano essere imputati al fatto che il periodo di campionamento era differente per ogni singola specie allo studio. Infatti, se il campionamento viene effettuato in anticipo o in ritardo anche di una settimana, può fornire risultati anomali. Riguardo a questo specifico aspetto, Herridge e Peoples (1990) suggeriscono di effettuare due campionamenti nella fase di inizio riempimento dei baccelli e di mediarli. In questo modo, è possibile ottenere valori di RUN (%) e di %Ndfa più stabili, anche perché le condizioni ambientali influenzano l'assorbimento di azoto dal suolo e dall'atmosfera e quindi la %Ndfa.

Quantificazione dell'azoto ipogeo derivante da fissazione atmosferica

Il bilancio azotato (Nbal) di una determinata leguminosa, può essere espresso come (McDonald, 1989 in Chalk, 1998):

$$\text{Nbal} = \text{Nleg}(\% \text{Ndfa} - \text{NHI}) \quad (17)$$

Il bilancio sarà quindi positivo quando l'indice di raccolto (NHI) è inferiore a %Ndfa della leguminosa.

Questo semplice modello è valido solo nel caso in

cui NHI venga quantificato correttamente, considerando cioè anche la parte ipogea. Inoltre, per la variabilità tra anni che caratterizza %Ndfa e NHI, la quantificazione del contributo della leguminosa al bilancio dell'azoto deve essere valutata attraverso sperimentazioni pluriennali. Ciò vale in particolare se la misura del bilancio viene fatta a partire dalle variazioni del contenuto di azoto totale nel terreno, che tengono conto della variabilità interannuale delle altre componenti positive (precipitazioni, fertilizzanti) e negative (lisciviazione, volatilizzazione, denitrificazione) del bilancio dell'azoto. Inoltre, per tener conto della variabilità spazio-temporale del contenuto di azoto totale nel terreno, il monitoraggio deve prevedere campionamenti con un numero di ripetizioni definito in base ad una preliminare stima della varianza errore e alla precisione voluta.

Chalk (1998) descrive diversi metodi basati sull'uso dell'isotopo ^{15}N per misurare direttamente il trasferimento di azoto fissato dall'atmosfera al terreno.

Un primo metodo è simile al metodo IR già descritto e prevede l'esposizione in ambiente controllato e per periodi brevi (1-3 giorni) di radici nodulate di leguminose ad un'atmosfera arricchita con $^{15}\text{N}_2$. Con questo metodo, più che i valori assoluti, si misura la ripartizione dell'azoto marcato tra parte epigea (foglie e steli) ed ipogea (radici e suolo). I risultati ottenuti da Ruschel et al. (1979) indicano sul fagiolo e soia che da un terzo ad un quarto dell'azoto fissato è traslocato alle parti ipogee o rilasciato nel terreno. Il limite principale di questa tecnica è che i risultati sono riferiti ad un breve periodo del ciclo colturale e alla difficoltà tecnica a recuperare i tessuti radicali.

Un'altro metodo, i cui risultati sono riferibili ad un periodo più lungo, è quello che prevede l'applicazione fogliare di ^{15}N , assumendo che questo determini un arricchimento isotopico uniforme tra apparato epigeo ed ipogeo. Il metodo si basa sul principio che la fonte di arricchimento isotopico del terreno sia esclusivamente legata ad azoto che proviene dalla leguminosa. In questo modo, misurando l'incremento di ^{15}N dell'azoto nel terreno, è possibile stimare quanto dell'azoto della leguminosa contribuisce all'azoto totale del terreno.

I materiali e i protocolli utilizzati per l'applicazione di questo metodo da diversi autori sono numerosi: fertilizzanti fogliari contenenti $^{15}\text{NH}_3$ in grado di arricchire isotopicamente la biomassa epigea (Zebarth et al., 1991); fiale contenenti $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Jensen, 1996b), urea arricchita al 99% (Høgh-Jensen e Schjoerring, 2001), oppure $^{15}\text{NH}_3$ (McNeill et al., 1997, 1998) nelle quali venivano introdotte le foglie o le foglioline con o senza i piccioli; microtubi, inseriti in un foro effettuato nello stelo, collegati ad un serbatoio contenente $^{15}\text{NH}_3$ (Russel e Fillary, 1996a, b); l'iniezione diretta di $^{15}\text{NH}_3$ all'interno degli steli delle piante (Rochester et al., 1998). Una recente sperimentazione di Khan et al. (2002a) indica quali sono i principali criteri da rispettare per la marcatura con ^{15}N finalizzata alla misura dell'azoto ipogeo delle leguminose:

- il ^{15}N somministrato alla parte epigea deve arricchire uniformemente la parte epi ed ipogea della pianta;
- il metodo di marcatura deve essere rapido, adatto alla specie considerata e non deve determinare un danneggiamento della coltura;
- il ^{15}N che raggiunge la rizosfera attraverso la fitomassa epigea deve derivare esclusivamente da radici e noduli e non da parti senescenti dell'apparato epigeo;

- l'arricchimento in ^{15}N dell'azoto radicale nel suolo deve essere uniforme e avere lo stesso livello di arricchimento delle radici che è stato possibile raccogliere;
- l'arricchimento isotopico dei tessuti vegetali e del suolo deve essere tale da poter essere distinguibile rispetto all'abbondanza naturale del ^{15}N nel suolo.

I diversi approcci (es. marcatura dell'azoto atmosferico, delle parti epigee delle piante e delle radici) e le varie tecniche nell'ambito di ciascuno, sono stati sviluppati in specifiche sperimentazioni e sono caratterizzati ognuno da specifici vantaggi e limiti di applicazione. Ciò rende poco probabile la definizione di un protocollo unico per tutte le leguminose (Khan et al., 2002a), per cui si rimanda ai lavori specifici per i dettagli procedurali.

Una delle tecniche più rapide ed efficaci è quella basata sulla marcatura di foglie e piccioli (Khan et al., 2002a). Un limite di questa tecnica, evidenziato dagli stessi autori, è quello che l'arricchimento isotopico dei tessuti radicali del fittone e delle principali ramificazioni, che si riesce facilmente a separare dal terreno, potrebbe essere sostanzialmente diverso da quello delle frazioni distali, che sono molto difficili da separare dal suolo, perché possono essere caratterizzate da un grado di nodulazione (e quindi un $\delta^{15}\text{N}$) sostanzialmente differente rispetto alle radici prossimali. Ciò potrebbe comportare sovrastime o sottostime dell'azoto ipogeo derivante dalla leguminosa, soprattutto in suoli argillosi (Khan et al., 2002a). Un approccio alternativo potrebbe essere quello di assumere che la nodulazione avvenga principalmente in prossimità della corona e di correggere i risultati in base al rapporto di arricchimento tra radici nodulate e non nodulate (Khan et al., 2002a). Tuttavia, le indicazioni di questi autori non si riferiscono a sperimentazioni condotte in condizioni di campo.

Un'applicazione interessante del metodo della marcatura fogliare per la quantificazione dell'azoto nel suolo derivante da rizodeposizione (i.e. essudati radicali, turnover radichette distali e noduli rilasciati nella rizosfera) su prati di leguminose e graminacee in purezza o in miscuglio, è riportato da Høgh-Jensen e Schjoerring (2001), che indicano rilasci di N nel suolo sino a 80-87% dell'N totale ipogeo derivante dalla coltura, nell'arco di un biennio, corrispondenti a quantitativi da 1,05 a 2,77 volte la produzione di azoto epigeo. Di questo, gran parte derivava da fissazione simbiotica.

Il metodo ID può essere impiegato per misurare l'azoto ipogeo delle leguminose se si assume che l'input di azoto fissato dall'atmosfera in un suolo arricchito possa determinare nel terreno una diluizione misurabile del ^{15}N . La proporzione di azoto totale nel suolo derivante dall'azotofissazione ($\% \text{TSN}_{\text{dfa}}$) si stima in base all'eccesso isotopico dell'azoto totale nel suolo (TSN) alla semina e alla raccolta della leguminosa (Chalk, 1998):

$$\% \text{TSN}_{\text{dfa}} = 1 - \frac{\text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{TSN}_{\text{raccolta}}}}{\text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{TSN}_{\text{semina}}}} \quad (18)$$

La quantità di azoto fissato che contribuisce ad arricchire il pool di composti azotati del suolo (TSN_{fix}) si ottiene da:

$$\text{TSN}_{\text{fix}} = \% \text{TSN}_{\text{dfa}} \cdot \text{TSN}_{\text{raccolta}} \quad (19)$$

Un'altro metodo, noto come *split-root system*, prevede la stima della percentuale di azoto ipogeo attraverso

l'esposizione di una parte dell'apparato radicale ad una soluzione arricchita con ^{15}N e il successivo recupero del tracciante nelle parti epigee e in quelle ipogee non marcate (Jensen, 1996a, 1996b; Sawatsky and Soper, 1991). Una volta calcolata la quantità di residui colturali rilasciate nel terreno dalla leguminosa, è possibile stimare le quantità di azoto rilasciate nel terreno, attraverso la seguente equazione:

$$\% \text{N}_{\text{dfa}} = 1 - \left(\frac{^{15}\text{N}_{\text{leg}}}{^{15}\text{N}_{\text{ref}}} \right) \quad (20)$$

Dove $^{15}\text{N}_{\text{leg}}$ e $^{15}\text{N}_{\text{ref}}$ indicano gli eccessi isotopici della leguminosa e della specie di riferimento non-azotofissatrice. Nota la $\% \text{N}_{\text{dfa}}$ del residuo colturale, la quantità di azoto in esso presente ($\% \text{N} \times \text{fitomassa kg ha}^{-1}$) permetterà di stimare la quantità di N fissato che potrebbe essere rilasciata in seguito alla sua decomposizione.

Diversi metodi (marcatura della parte epigea, metodo ID, metodo del bilancio e campionamento delle parti ipogee) per la quantificazione del contributo dell'azoto ipogeo derivante dall'azotofissazione della leguminosa al bilancio azotato del suolo, sono stati descritti in dettaglio e messi a confronto da Khan et al. (2002b), che sono giunti alle seguenti conclusioni:

- Il metodo basato sul campionamento delle parti ipogee della pianta è il meno affidabile, in quanto determina una forte sottostima dell'azoto ipogeo, per la grande quantità di radici perse durante il campionamento e per la selettività operata nel recupero di radici con o senza noduli. In ogni caso, anche nell'ipotesi di raccogliere tutte le radici, il metodo non terrebbe conto delle rilevanti frazioni di azoto della leguminosa rilasciate per rizodeposizione (Høgh-Jensen e Schjoerring, 2001) o del turnover delle radichette distali, più fini, nonché dell'azoto dei noduli che viene rilasciato durante il ciclo colturale (Jensen, 1996; McNeill et al., 1997 in Khan et al., 2002a; Unkovich e Pate, 2000). Mediamente, la quantità di azoto ipogeo delle leguminose stimata con questo metodo corrisponde al 20-30% rispetto a quella ottenuta con altri metodi (Khan et al., 2002b).
- Il metodo della marcatura della parte epigea ha come principale limite la possibile violazione dell'assunto dell'uniforme arricchimento isotopico di tutta la pianta, incluse le radici e l'azoto derivante da rizodeposizione, che non sempre è rispettato, in particolare per alcune leguminose (Khan et al., 2002a). Gli stessi autori hanno stimato rispettivamente pari a 1,12 e 1,56 il rapporto tra radici non nodulate e nodulate per fava e cece (Khan et al., 2002a). Una procedura simile è riportata da Shah et al. (2003).
- In alcune circostanze e con alcune specie, potrebbe essere stimato il contenuto percentuale di azoto ipogeo (BGN) rispetto all'azoto totale della leguminosa attraverso la ripartizione del ^{15}N tra parti epigee ed ipogee (radici e suolo della rizosfera), dopo aver marcato le parti aeree, utilizzando la formula del bilancio del ^{15}N :

$$\text{BGN}\% = 100 \frac{^{15}\text{N}_{\text{radici}} + ^{15}\text{N}_{\text{suolo}}}{^{15}\text{N}_{\text{radici}} + ^{15}\text{N}_{\text{suolo}} + ^{15}\text{N}_{\text{epigee}}} \quad (21)$$

I dati relativi alla quota di N del suolo derivante dalla leguminosa ottenuti da Khan et al. (2002b) con questo metodo variano dal 15% per *Vigna radiata* al 57% per *Cajanus cajan*, con valori intermedi per fava e cece.

Quantificazione dell'azoto delle leguminose che si rende disponibile per la coltura in successione

È noto che un cereale, in successione con una leguminosa foraggera o da granella, può avere degli incrementi produttivi superiori anche del 30-50%, rispetto a quelli ottenuti in regime di omosuccessione (Evans et al., 1991). Questa risposta viene in genere attribuita alla migliore disponibilità di azoto minerale nel terreno coltivato con una leguminosa, sebbene questi effetti possano combinarsi in vario modo con altri dovuti a fattori non direttamente legati con l'azoto, quali il miglioramento delle caratteristiche fisiche del suolo, risanamento da fitofagi e parassiti ecc.

La verifica se gli effetti dell'avvicendamento colturale con leguminose sulla produttività dei cereali siano legati esclusivamente o parzialmente all'azoto, può essere effettuata con una prova di concimazione con dosi crescenti di azoto al cereale in successione a se stesso o ad una leguminosa (Chalk, 1998). I riferimenti bibliografici sull'argomento sono prevalentemente esteri. In Australia, su 26 rotazioni frumento-frumento o frumento-lupino, 12 risposte positive sono risultate chiaramente indipendenti dall'azoto e solo 5 sono state attribuite esclusivamente alla nutrizione azotata (Rowland et al., 1988 in Chalk, 1998).

Il contributo alla nutrizione azotata della coltura in successione alla leguminosa è legato ai tessuti epigei senescenti che non vengono raccolti e cadono al suolo, a radici, noduli ed essudati radicali. A causa delle oggettive difficoltà di misura, il contributo alla fertilità azotata del suolo delle frazioni ipogee delle leguminose è spesso ignorato o sottostimato. Recentemente, è stato dimostrato che il potenziale ruolo svolto da queste frazioni può essere molto rilevante nel bilancio azotato del sistema colturale (Khan et al., 2002a; 2002b).

Nell'ambito degli effetti positivi indotti da una migliore funzione di nutrizione azotata, è necessario distinguere quelli legati all'uso più parco dell'azoto minerale del suolo da parte della leguminosa (*N-sparing*), in virtù della sua capacità di approvvigionarsi di azoto dall'atmosfera (Chalk, 1998; Khan et al., 2002), da quelli dovuti all'aumentata disponibilità netta di azoto. L'*N-sparing* può essere misurato direttamente, quantificando l'azoto minerale presente nel suolo dopo la raccolta di leguminose o non leguminose (Herridge et al., 1995; Peoples et al., 1995). Tuttavia, secondo Unkovich et al. (1997), la maggiore quantità di azoto minerale nel terreno dopo leguminosa rispetto a dopo cereale, potrebbe derivare da una più rapida mineralizzazione dell'azoto organico più che da un minore assorbimento da parte della specie azotofissatrice.

Chalk (1998) illustra due possibili metodi per la quantificazione del trasferimento di azoto fissato biologicamente alla coltura in successione: uno basato su un modello statico, l'altro sulla diluizione dell'isotopo ^{15}N .

In base al modello statico, descritto per la prima volta da Myers e Wood (1987), l'azoto fissato che si rende disponibile per la coltura in successione (Nfix_{cer}), dipende dalla proporzione di azoto totale della leguminosa derivante da azotofissazione ($\% \text{Ndfa}$) che si trova nei residui colturali ($1-\text{NHI}$), moltiplicato per l'efficienza (E) di assorbimento dell'azoto della leguminosa che si mineralizza nell'arco del ciclo colturale della coltura in successione ($\% \text{Nmin}$):

$$\text{Nfix}_{\text{cer}} = \% \text{Ndfa}(1-\text{NHI})\% \text{Nmin} \cdot E \quad (22)$$

Sisworo et al. (1990) hanno somministrato al cereale (riso) residui colturali marcati e non marcati con ^{15}N della leguminosa (fagiolo dall'occhio) e misurato $\% \text{Nmin} \cdot E$ attraverso la formula:

$$\% \text{Nmin} \cdot E = \frac{N_{\text{cer}} \cdot \text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{cer}}}{N_{\text{res}} \cdot \text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{res}}} \quad (23)$$

dove N_{cer} e N_{res} rispettivamente erano il contenuto di azoto totale del cereale e dei residui colturali della leguminosa (Chalk, 1998).

In base a questo modello, si può sottostimare Nfix_{cer} perché molti dei parametri possono facilmente essere sottostimati, come ad esempio i residui colturali ipogei della leguminosa e le frazioni senescenti della fitomassa epigea che cadono sul terreno. Anche l'efficienza di assorbimento dell'azoto da parte del cereale è spesso sottostimata, perché misurata in genere solo sulle parti epigee (Chalk, 1998).

In alternativa, per stimare $\% \text{Ndfa}_{\text{cer}}$, cioè la proporzione dell'azoto del cereale derivante dall'azotofissazione della leguminosa in precessione colturale, può essere utilizzato il metodo ID (Chalk, 1998):

$$\% \text{Ndfa}_{\text{cer}} = 1 - \frac{\text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{cereale}}(\text{leg-cer})}{\text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{cereale}}(\text{nonleg-cer})} \quad (24)$$

dove $\text{eccesso}^{15}\text{N}_{\text{cereale}}$ si riferisce all'eccesso isotopico dell'azoto del cereale rispettivamente nella successione con leguminosa (leg-cer) o con non leguminosa (nonleg-cer).

I risultati riportati da diversi autori che hanno utilizzato questo metodo, indicano $\% \text{Ndfa}_{\text{cer}}$ raramente superiori al 25% (Chalk, 1998). Tuttavia, la gestione conservativa dei residui colturali della leguminosa, può contribuire significativamente ad aumentare questa percentuale (Shah et al., 2003).

Secondo Chalk (1993), è corretto considerare la diluizione del ^{15}N come prodotto esclusivo del trasferimento al cereale dell'azoto fissato dalla specie azotofissatrice. Il metodo ID può essere quindi utilizzato anche per quantificare la quota dell'azoto assorbito dal cereale deriva dall'azotofissazione della leguminosa che lo ha preceduto.

Uno studio finalizzato alla stima degli apporti azotati da parte di una leguminosa nell'avvicendamento colturale deve essere impostato considerando un congruo e pluriennale periodo di sperimentazione, in relazione alla velocità con cui procedono i processi di degradazione dei residui colturali e dell'azoto nel terreno. Ciò implica, come evidenziato da Chalk (1998), esperimenti di lunga durata, gli unici veramente utili a verificare sperimentalmente se il bilancio dell'azoto di un determinato sistema colturale basato su leguminose è realmente positivo.

Considerazioni conclusive

La crescente facilità di accesso alle metodologie basate sull'impiego dell'isotopo ^{15}N , caratterizzate dalla possibilità di quantificare l'azotofissazione simbiotica in condizioni di pieno campo, in maniera indipendente dalla produzione di fitomassa e con misure integrate nel tempo, ha dato un forte impulso alla ricerca finalizzata al controllo agronomico dei fattori che limitano il processo di azotofissazione e al miglioramento genetico di leguminose e relativi rizobi.

Attraverso l'analisi delle metodologie, questo lavoro intende contribuire a ridurre in tempi rapidi il *gap* di conoscenze sull'azotofissazione delle principali leguminose dei sistemi colturali italiani rispetto allo stato dell'arte internazionale.

Il progetto PRIN Azotofissazione ha permesso significativi progressi nell'acquisizione di dati sul ruolo dell'azotofissazione delle leguminose in sistemi colturali ecocompatibili. Tuttavia, al fine di ottenere indicazioni tali da poter essere trasferibili alla tecnica agronomica, occorre investire ulteriormente nella sperimentazione di campo. Per quanto riguarda gli aspetti metodologici, la prosecuzione delle ricerche dovrebbe prevedere alcuni approfondimenti sugli aspetti metodologici, in particolare quelli che maggiormente sono sensibili alle specificità ambientali, come quelli relativi alla scelta delle specie di controllo e alla quantificazione dell'azoto ipogeo derivante da azotofissazione.

Il dibattito scientifico sugli aspetti metodologici è per molti aspetti ancora aperto e le informazioni derivanti da sperimentazioni agronomiche di pieno campo e di lunga durata, sono indispensabili per la quantificazione del bilancio azotato del suolo nel medio e lungo periodo.

A tal proposito nuovi protocolli sperimentali sono stati sviluppati anche negli ultimi tre anni, con particolare attenzione all'esigenza di rivalutare il contributo dell'azoto ipogeo delle leguminose derivante da fissazione simbiotica (Khan et al., 2002a, 2002b) e di ottimizzare le metodiche esistenti per applicazioni di pieno campo (Reiter et al., 2002).

Sono necessari approfondimenti sito-specifici anche per verificare le possibilità e le potenzialità di applicazione del metodo NA, che appare una delle strade più promettenti per valutazioni su ampia scala (Reiter et al., 2002). Sono inoltre necessarie verifiche sperimentali di pieno campo per mettere a punto una metodologia affidabile per quantificare il destino dell'N fissato nella successione colturale. Da questo punto di vista, sembrerebbe che il metodo ID, in particolare su suoli argillosi, possa garantire un buon compromesso tra complessità di applicazione e affidabilità dei risultati.

È necessario raccogliere dati a livello nazionale sulla ripartizione dell'azoto fissato tra suolo, prodotto asportato e residui colturali, utili ad integrare le metodologie sperimentali di campo con la modellistica del ciclo dell'azoto e del bilancio del ^{15}N , che permettano di acquisire indicazioni utili ad interpretare correttamente la dinamica del ciclo dell'azoto nei suoli italiani e da queste trarre le opportune indicazioni tecniche.

Da ultimo, è utile riflettere sulle modalità con le quali i risultati degli investimenti nella ricerca e sperimentazione sull'argomento possano essere tradotte nella pratica agricola. Nella letteratura scientifica raramente si trovano riscontri su analisi e bilanci condotti a livello di intero sistema colturale, comprendendo in questo caso anche aspetti "soff" legati al contesto socio-economico e culturale. Questi aspetti rappresentano un ulteriore sviluppo degli aspetti metodologici su aspetti meno quantitativi, che richiede un'integrazione disciplinare di non facile realizzazione, ma con la prospettiva di vedere più facilmente tradotte nella pratica le teorie sviluppate con le ricerche scientifiche (Roggero e Silvestri, 2002).

Bibliografia

- Ballatore B. 2001. Stima dell'Azoto fissazione della Sulla (*Hedysarum coronarium*) in ambiente Mediterraneo. Tesi di Dottorato di Ricerca XIV Ciclo in "Produttività delle Piante Coltivate", Università degli Studi di Sassari e Palermo.
- Bazzicalupo M., Mengoni A., Biondi E., Polsinelli M. 2001. L'azotofissazione come contributo alla sostenibilità. In: Ranallied P. ed. Leguminose e agricoltura sostenibile. Calderini edagricole, 68.
- Broadbent F.E., Nakashima T., Chang G.Y. 1982. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agron. J.*, 74:625-628.
- Burris R.H. e Miller C.E. 1941. Application of ^{15}N to the study of biological Nitrogen fixation. *Science* 93:2405-2406.
- Carranca C., De Varennes A., Rolston D.E. 1999. Biological nitrogen fixation estimated by ^{15}N dilution, natural ^{15}N abundance, and N difference techniques in a subterranean clover-grass sward under Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.*, 10:81-89.
- Chalk P.M. e Ladha J.K. 1999. Estimation of legume symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on ^{15}N dilution. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1901-1917.
- Chalk P.M. 1985. Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application. *Soil Biol. Biochem.*, 17:47-55.
- Chalk P.M. 1998. Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Austr. J. Agric. Res.*, 49:303-316.
- Danso S.K.A. 1995. Assessment of biological nitrogen fixation. *Fert. Res.*, 42:3-41.
- Danso S.K.A., Hardarson G., Zapata F. 1993. Misconceptions and practical problems in the use of ^{15}N soil enrichment techniques for estimating N_2 fixation. *Plant Soil*, 152:25-52.
- Eusebi L., Roggero P.P., Seddaiu G. 2003. Effetti dell'intensità di utilizzazione sulla produzione foraggera e l'azotofissazione della sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Riv. Agron.*, in questo numero.
- Evans J., Fettel N.A., Coventry D.R., O'Connor G.E., Walscott D.N., Mahoney J., Armstrong E.L. 1991. Wheat response after temperate crop legumes in southwestern Australia. *Austr. J. Agric. Res.*, 42:31-43.
- Fried M., Danso S.K.A., Zapata F. 1983. The methodology of measurement of N_2 fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Can. J. Microb.*, 29:1053-1062.
- Fried M., Dean L.A. 1952. A concept concerning the measurement of available soil nutrients. *Soil Sci.*, 73:263-271.
- Fried M., Middleboe V. 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by legume crop. *Plant Soil*, 43:713-715.
- Giller K.E., Cadisch G. 1995. Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant Soil*, 174:255-277.
- Grignani C., Acutis M., Cavallero A., Ducco G. 1997. Effetti della fertilizzazione organica su colture foraggere: disponibilità di azoto minerale nel suolo e previsione della lisciviazione. Comunicazione al XXXI Convegno SIA, Milano, 24-26 giugno.
- Hardarson G., Zapata F., Danso S.K.A., Golbs M. 1988. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Sci.*, 28:101-105.
- Hardy R.W.F., Holstein R.D. 1977. Methods for measurement of dinitrogen fixation. In: Hardy R.W.F., Gibson

- A.H. eds. A treatise on dinitrogen fixation. IV. Agronomy and Ecology. New York: Wiley. 451-486.
- Herridge D.F. 1984. Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root – bleeding and vacuum-extracted exudates of soybean. *Crop Sci.*, 24:173-179.
- Herridge D.F. 1988. The narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. I Indices of nitrogen fixation. *Aust. J. Agric. Res.*, 39:1003-15.
- Herridge D.F., Doyle A.D. 1988. The narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. II Estimates of fixation by field grown crops. *Aust. J. Agric. Res.*, 39:1017-1028.
- Herridge D.F., Marcellos H., Felton W.L., Turner G.L., Peoples M.B. 1995. Chickpea increases soil N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 27:545-551.
- Herridge D.F., Peoples M.B. 1990. The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. *Plant Physiol.*, 93:495-503.
- Herridge D.F., Peoples M.B. 2002. Timing of xylem sampling for ureide analysis of nitrogen fixation. *Plant Soil*, 238:57-67.
- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K. 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biol. Biochem.*, 33:439-448.
- Jensen E.S. 1996a. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, 28:65-71.
- Jensen E.S. 1996b. Barley uptake of N deposited in the rhizosphere of associated field pea. *Soil Biol. Biochem.* 28:159-168.
- Khan F., Peoples M.B., Herridge D.F. 2002a. Quantifying below ground nitrogen of legumes. 1. Optimising procedures for ¹⁵N shoot-labelling. *Plant Soil*, 245:327-334.
- Khan F., Peoples M.B., Chalk P.M., Herridge D.F. 2002b. Quantifying below ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of ¹⁵N and non isotopic methods. *Plant Soil*, 239:277-289.
- Knowles R., Blackburn T.H. eds. 1993. Nitrogen isotope techniques. London: Academic press. 311 pp.
- Ledgard S.F., Steele K.W. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed/grass pastures. *Plant Soil*, 141:137-153.
- Marriott C.A., Haystead A. 1993. Nitrogen fixation and transfer. *Sward measurement handbook*, 245-264.
- Mariotti A. 1983. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. *Nature*, 303:685-687.
- Materon L.A. 1993. Practical Rhizobium-legume technology manual. Technical Manual no. 19. ICARDA, 343-348.
- Mc Donald G.K. 1989. The contribution of nitrogen fertilizer to the nitrogen nutrition of rainfed wheat crop in Australia: a review. *Austr. J. Exp. Agric.*, 29:455-481.
- McNeill A.M., Pilbeam C.J., Harris H.C., Swift R.S. 1996. Seasonal variation in the suitability of different methods for estimating biological nitrogen fixation by grain legumes under rainfed conditions. *Aust. J. Agric. Res.*, 47:821-828.
- McNeill A.M., Zhu C., Fillery I.R.P. 1997. Use of in situ ¹⁵N-labelling to estimate the total below-ground nitrogen of pasture legumes in intact soil-plant systems. *Austr. J. Agric. Res.*, 48:295-304.
- McNeill A.M., Zhu C., Fillery I.R.P. 1998. A new approach to quantifying the N benefit from pasture legumes to succeeding wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 49:427-436.
- McAuliffe C., Chamblee D.S., Uribe-Arango H., Woodhouse jr. W.W. 1958. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by N. *Agron. J.*, 50:334-337.
- Myers R.J.K., Wood I.M. 1987. Food legumes in the nitrogen cycle of farming systems. In: Wallis E.S., Byth D.E. eds. *Food legume improvement for Asian farming systems*. Canberra, 46-52.
- Papastylianou I. 1993. Estimating total N₂ fixation by legumes in long-term rotation studies. *Eur. J. Agron.*, 2:1, 1-10.
- Pate J.S., Unkovich M., Armstrong E.L., Samford P. 1994. Selection of reference plants for ¹⁵N natural abundance assessment of N₂ fixation by crop and pasture legumes in South-West Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, 45:133-147.
- Peoples M.B., Faizah A.W., Rerkasem B., Herridge D.F. 1989. *Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field*. ACIAR (Australian Centre for International Agricultural Research) Monograph N. 11, ACIAR, Canberra. 1-69.
- Peoples M.B., Herridge D.F., Ladha J.K. 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil*, 174:3-28.
- Reiter K., Smidtke K., Rauber R. 2002. Estimation of symbiotic N₂ fixation by a low-level, large-scale ¹⁵N application technique. *Soil Biol. Biochem.*, 34:303-314.
- Rennie R.J. 1984. Comparison of N Balance and ¹⁵N Isotope Dilution to Quantify N₂ Fixation in Field-Grown Legumes. *Agron. J.*, 76:785-790.
- Rennie R.J., Rennie D.A. 1983. Techniques for quantifying N₂ fixation in association with non legumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microb.*, 29:1022-1035.
- Rochester I.J., Peoples M.B., Constable G.A. Gault R.R. 1998. Faba bean and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Austr. J. Exp. Agric.*, 38: 253-260.
- Roggero P.P., Silvestri N. 2002. Elementi per un'analisi integrata dei sistemi colturali. In: Bonari E. e Ceccon P. eds. *Verso un approccio integrato allo studio dei sistemi colturali*. Milano: Franco Angeli ed. 121-144.
- Rushel A.P., Salati E., Vose P.B. 1979. Nitrogen enrichment of soil and plant by Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris symbiosis. *Plant Soil*, 51:425-9.
- Russell C.A., Fillery I.R.P. 1996a. In situ labelling of lupin below-ground biomass. *Aust. J. Agric. Res.*, 47:1035-1046.
- Russell C.A., Fillery I.R.P. 1996b. Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 47:1047-1059.
- Sanginga N., Zapata F., Danso S.K.A., Bowen G.D. 1990. Effect of successive cuttings on uptake and partitioning of ¹⁵N among plant parts of *Leucaena leucocephala*. *Biol. Fert. Soils*, 9:37-42.
- Sawatasky N., Soper R.J. 1991. A quantitative measurement of the nitrogen loss from the root system of field peas (*Pisum avense* L.) grown in the soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23:255-259.
- Shah Z., Shah S.H., Peoples M.B., Schwenke G.D., Herridge D.F. 2003. Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research*, 4157:1-11.
- Shearer G., Kohl D.H. 1993. Natural abundance of ¹⁵N: fractional contribution of two sources to a common sink and use of isotope discrimination. In: Knowles R., Blackburn T.H. eds., *Nitrogen isotope techniques*. London: Academic press. 89-125.
- Sisworo W.H., Mitrosuhardjo M.M., Rasjid H., Myers R.J.K. 1990. The relative roles of N fixation, fertilizer, crop residues and soil in supplying N in multiple cropping systems in a humid, tropical upland cropping systems. *Plant Soil*, 121:73-82.

- Song L., Carroll B.J., Gresshoff P.M., Herridge D.F. 1995. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for yield, N₂ fixation and benefit to subsequent crops. *Soil Biol. Biochem.*, 27:563-569.
- Stülpnagel R. 1982. Schätzung der von Ackerbohnen symbiontisch fixierten stickstoffmenge im feldversuch mit der erweiterten differenzmethode. *J. Agron. Crop Sci.*, 151:446-458.
- Unkovich M.J., Pate J.S., Lefroy E.C., Davidi J.A. 2000. Nitrogen isotope fractioning in the fodder tree legume tagasaste (*Chamaecytisus proliferus*) and assessment of N₂ fixation inputs in deep sandy soils of Western Australia. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 27:921-929.
- Unkovich M.J., Pate J.S., Sanford P. and Armstrong E.L. 1994. Potential precision of the ¹⁵N Natural Abundance Method in field estimates of Nitrogen fixation by crop and Pasture Legumes in South Western Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, 45:119-132.
- Unkovich M.J., Pate J.S. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crop Res.*, 65:211-228.
- Unkovich M., Samford P., Pate J.S. 1996. Nodulation and nitrogen fixation by subterranean clover in acid soils as influenced by lime application, toxic aluminium, soil mineral N and competition from annual ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 4/5:639-648.
- Vose P.B., Victoria E.L. 1986. Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. *Soil Sci. Soc. of Am. J.*, 677:23-41.
- Wagner G.H., Zapata F. 1982. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agron. J.*, 74:607-612.
- Warembourg F.R., Montange D., Bardin R. 1982. The simultaneous use of ¹⁴CO₂ and ¹⁵N₂ labelling techniques to study the carbon and nitrogen economy of legumes grown under natural conditions. *Physiol. Plant.*, 56:46-55.
- Warembourg F.R. 1993. Nitrogen fixation in soil and plant systems. In: Knowles R., Blackburn T.H. eds., *Nitrogen Isotope Techniques*. New York: Academic Press. 127-156.
- Wilson K.J., Peoples M.B., Jefferson R.A. 1995. New techniques for studying competition by rhizobia and for assessing nitrogen fixation in the field. *Plant Soil*, 174:241-253.
- Witty J.F. 1983. Estimation of the N₂-fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertiliser: some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.*, 15:631-640.
- Witty J.F., Minchin F.R. 1988. Measurements of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay: myths and misteries. In: Bech D.P., Materon L.A. eds. *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture*. Martinus Nijhoff. 331-344.
- Wood M. 1996. Nitrogen fixation: how much and at what cost? In: Younne D. ed. *Legumes in sustainable farming systems*. BGS Occasional Symposium n. 30, 2-4 Sept. SAC-Aberdeen. 26-35.
- Zebarth B.J., Alder V., Sheard R.W. 1991. In situ labelling of legume residues with a foliar application of ¹⁵N-enriched urea solution. *Commonw. Soil Sci. Plant Anal.* 22, 437-447.