

## La nutrizione fogliare delle colture arboree da frutto

Moreno Toselli<sup>1\*</sup>, Diego Scudellari<sup>2</sup>, Victoria Fernandez<sup>3</sup> e Javier Abadia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna, viale Fanin 46, 40127 Bologna*

<sup>2</sup> *CRPV, via Tebano 45, Faenza (Ra)*

<sup>3</sup> *Departamento de Nutricion Vegetal, Estacion Experimental de Aula Dei, Apdo, 202, E-50080, Zaragoza (Spagna)*

Ricezione: 20 novembre 2008; Accettazione: 26 gennaio 2009

### Foliar nutrition of fruit trees

**Abstract.** Plant leaves absorb leaf-applied nutrients mainly through the cuticle, stomata, trichomes; the actual contribution of the stomatal versus the cuticular pathway remains unclear. Substances with low points of deliquescence will favour the penetration of nutrients supplied as foliar sprays. The occurrence of two distinct penetration pathways in the cuticle, for hydrophilic and lipophilic compounds has been suggested. Neutral, non-charged molecules penetrate the cuticle by dissolving and diffusing in lipophilic domains made of cutin and cuticular waxes (lipophilic pathway), while ionic species may penetrate the leaf through aqueous pores (hydrophilic pathway). The response to foliar fertilization increases when tree mineral status is insufficient and if the nutrients are supplied in available forms. The sprayed solution is retained in the target tissues, then it penetrates the plant surface, it enters into the apoplast, and it is transported to the tissues where it is demanded. Foliar application is recommended: 1) to apply micronutrients such as Fe, Mn, Zn, B, etc. (because of their low plant requirement); 2) when soil constraints like high pH, calcium carbonate, moisture, low temperature, clay, etc. limit the availability of soil nutrients; 3) to prevent or overcome transient nutrient deficiencies of nutrients. Factors with positive effects on leaf nutrient absorption are: air relative humidity, that promotes the salt hydration; moderately high temperatures, that increase wax fluidity and non-ionic molecules mobility; photosynthetic radiation, that stimulates stomatal opening and photosynthesis; the use of surfactants, that lower surface tension and contact angles. Young, partially expanded leaves are more penetrable than fully-expanded leaves, potentially because of their higher penetration efficiency through stomata, higher presence of trichomes, thinner cuticle and lower wax deposits. Since stomata are often present in the abaxial leaf side, this surface is normally more efficient in nutrient uptake than the upper one. In the case of iron, a nutrient often supplied through the leaves, deficiency reduces leaf size and surface smoothness, increases leaf transpiration rate and promotes stoma-

ta closure with a final reduction of nutrient uptake. The plasma membrane absorption rate is fast at the beginning because of the high concentration gradient that promotes a passive movement across membrane channels or by specific transporters. In the cytoplasm nutrients are metabolized, and only mobile nutrients (N, P, K, B) may move to other plant organs such as reproductive or storage tissues.

**Key words:** leaf cuticle, fertilizers, iron nutrition, macronutrients, stomata.

### Introduzione

Sebbene la radice sia l'organo preposto all'assorbimento di acqua e minerali dall'ambiente esterno, le foglie e gli altri organi della chioma hanno preservato, nel corso della evoluzione delle piante, la capacità di assorbire elementi minerali in soluzione acquosa. La pratica della concimazione fogliare sfrutta questa capacità al fine di fornire, attraverso la chioma, nutrienti ai vari tessuti della pianta col vantaggio di evitare il passaggio dal suolo, dove spesso le condizioni fisico-chimiche ed ambientali determinano immobilizzazioni, insolubilizzazioni e retrogradazioni che inibiscono l'assorbimento radicale favorendo nel contempo indesiderati perdite per dilavamento superficiali o percolazioni in profondità.

Non sorprende quindi l'interesse verso questa tecnica di concimazione che tuttavia presenta ancora molti aspetti da chiarire e la cui efficacia dipende dall'interazione di diverse variabili come confermano le risposte, spesso contrastanti, osservate sulle diverse colture. Lo scopo di questo lavoro è quello di analizzare le più recenti conoscenze sull'argomento al fine di individuare gli aspetti tecnici, le condizioni ambientali, lo stadio fenologico e fisiologico - nutrizionale dell'albero, che permettano l'utilizzo più razionale ed efficace della fertilizzazione fogliare. Per approfondimenti sull'argomento si rimanda il lettore alla review di Tagliavini e Toselli (2005) e per informazioni più dettagliate circa le interazioni tra la orga-

\* morenot@agrsci.unibo.it

nizzazione dei tessuti della foglia e i meccanismi di assorbimento dei nutrienti al recente lavoro di Fernández e Eichert (2009).

### Efficacia della concimazione fogliare

Al fine di ottenere un effetto positivo, la fertilizzazione fogliare deve soddisfare alcuni requisiti (Tagliavini e Toselli, 2005): 1. il fertilizzante deve essere in una forma assimilabile dai tessuti bersaglio (generalmente foglie e frutti) verso i quali è indirizzato; 2. l'organo bersaglio deve essere in grado di trattenere i nutrienti (capacità di ritenzione); 3. l'organizzazione dei tessuti epidermici, le condizioni ambientali, la natura chimica del composto devono permettere ai nutrienti, indipendentemente dalla loro forma (ionica o non ionica), di penetrare ed essere assorbiti attraverso la membrana citoplasmatica; 4. qualora il tessuto su cui si deposita la soluzione fertilizzante non corrisponda all'organo che manifesta carenza, è necessario che il nutriente sia mobile e che raggiunga la zona dove esso è richiesto.

In ogni caso, una risposta positiva è probabile solo quando il nutriente apportato con la concimazione fogliare costituisce un fattore limitante per lo sviluppo vegeto-produttivo; in caso contrario verranno favoriti gli squilibri nutrizionali nell'albero e si realizzerà un'inutile immissione di composti chimici nell'ambiente.

Rispetto alla tradizionale concimazione al terreno, la dose di nutrienti che è possibile apportare con la fertilizzazione fogliare è comunque inferiore: infatti,

al di sopra di una determinata concentrazione, la soluzione irrorata può risultare fitotossica. Calcoli eseguiti su impianti a bassa densità di susino europeo in California hanno permesso di stabilire che con una sola somministrazione fogliare è possibile garantire quantità significative e pari a circa il 5-6% delle richieste annuali di azoto (N) e potassio (K) (Weimbaum, 1988). La concimazione fogliare, da sempre considerata una via alternativa parziale alla somministrazione degli elementi al suolo, può quindi rappresentare uno strumento sia per restituire totalmente gli elementi a basso consumo quali fosforo (P), magnesio (Mg), ferro (Fe), manganese (Mn), zinco (Zn), boro (B), rame (Cu), ma anche una parte consistente dei macroelementi di elevato consumo come riportato da Fregoni (2000). Tale tecnica è particolarmente utile nei casi di condizioni climatiche, agronomiche o fisiologiche che limitano la capacità della radice di assorbire nutrienti dal terreno (tab. 1). Esempi di questo tipo si possono verificare quando sussistono condizioni climatiche avverse, come basse temperature ed elevata umidità del suolo, in concomitanza della ripresa vegetativa, in modo particolare quando, nell'annata precedente, si sono registrati elevati carichi produttivi con elevate asportazioni di nutrienti. Nel caso dell'N, ad esempio, situazioni di questo tipo corrispondono a limitazioni delle riserve immagazzinate e di conseguenza a una minore disponibilità dell'N rimobilizzato. In seguito allo scarso assorbimento radicale che si verifica in tali condizioni ambientali, l'N risulta così insufficiente a coprire il

Tab. 1 - Esempi di impiego di fertilizzanti per via fogliare nel melo (Scudellari e Tagliavini, 2000).

*Tab. 1 - Use of foliar fertilizers in apple production.*

Elementi minerali	Epoche d'impiego	Numero interventi e dosi	Condizioni che suggeriscono l'uso
Azoto	Pre- e post-fioritura	1-3 interventi con urea (0,5 kg/hl)	T° basse e ristagni idrici
Boro	Pre-fioritura	In funzione del formulato	Bassa concentrazione di B nel suolo (< 0,5 ppm B sol.) e/o nella foglia (< 20 ppm)
Magnesio	A partire dalla allegagione	2-3 interventi con MgSO <sub>4</sub> (0,5 – 1 kg/hl) o MgNO <sub>3</sub> (0,3 kg/hl)	Filloptosi precoce
Manganese	A partire dalla allegagione	2-3 interventi con MnSO <sub>4</sub> (200 g/hl)	Filloptosi precoce
Calcio	Da frutto noce a 20 giorni prima della raccolta	In funzione della varietà e della annata con CaNO <sub>3</sub> (0,5 kg/hl) o CaCl <sub>2</sub> (0,2 kg/hl)	Rischio di buttermatura amara
Azoto	Post-raccolta	1 intervento con urea (2-3 kg/hl)	Elevata produzione, carenza estiva
Boro	Post-raccolta	In funzione del formulato	Bassa concentrazione di B nel suolo (< 0,5 ppm B sol.) e/o nella foglia (< 20 ppm)

Legenda: MgSO<sub>4</sub> = solfato di magnesio; MgNO<sub>3</sub> = nitrato di magnesio; MnSO<sub>4</sub> = solfato di manganese; CaNO<sub>3</sub> = nitrato di calcio; CaCl<sub>2</sub> = cloruro di calcio

fabbisogno temporaneo per lo sviluppo vegetato-produttivo dell'albero.

Altre situazioni problematiche in cui il ricorso alla fertilizzazione fogliare risulta giustificato riguardano la presenza nel terreno di elevate concentrazioni di calcare e di pH sub-alcalino o alcalino che determinano la comparsa di sintomi di clorosi ferrica, una fisiopatia da carenza nutrizionale che colpisce molte specie in tutte le zone frutticole, compresa la vite. Le primavere molto piovose predispongono particolarmente a questa sintomatologia, la quale viene aggravata anche da fattori colturali quali le lavorazioni del terreno, le elevate concimazioni azotate (nitriche soprattutto) e gli elevati carichi produttivi per pianta (Bavaresco, 2002). I sintomi tipici della clorosi ferrica sono l'ingiallimento delle zone internervali della lamina fogliare (a partire dalle foglie apicali del germoglio), l'arresto dello sviluppo del germoglio, la colatura (ovvero, la caduta dei fiori) con conseguente perdita di produzione (Bavaresco, 2002; Rombolà e Tagliavini, 2006). Il numero e la pezzatura dei frutti risultano così ridotti, con caratteristiche qualitative (colore, consistenza, acidità, ecc.) penalizzate (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2006).

Tra le varie tecniche di prevenzione e cura della clorosi ferrica, vi è la somministrazione di formulati a base di Fe sia per via radicale che per via aerea (Lucena, 2006). La fertilizzazione fogliare ha il vantaggio di essere più economica e precisa di quella radicale, tuttavia la sua efficacia è molto variabile in funzione della specie, dell'ambiente e dei fattori chimici e fisici ad essi correlati (Fernandez e Ebert, 2005). L'efficacia dei formulati di Fe applicati alla chioma è in genere valutata sulla base del rinverdimiento fogliare, della velocità di assorbimento e traslocazione del Fe (Fernandez *et al.*, 2006).

La limitazione della funzionalità dell'apparato radicale si presenta anche in condizioni di asfissia (minore solubilità del Fe e dei metalli in genere), in presenza di argille molto affini al K (sequestro dell'elemento e riduzione della disponibilità in soluzione, come riportato da Poni *et al.*, 2003) e con basse temperature radicali, che riducono l'assorbimento di nutrienti come ad esempio l'N (Toselli *et al.*, 1999).

La concimazione fogliare può essere utilmente adottata per incrementare le riserve di nutrienti (in particolare N), poco prima della caduta delle foglie, in modo da poter contare, alla ripresa vegetativa dell'anno successivo, su maggiori sostanze di riserva (aminoacidi) utilizzabili nelle prime fasi del germogliamento. Si è dimostrata efficace nel curare e/o prevenire carenze di calcio (Ca) nei frutti delle pomacee e prevenire le fisiopatie del post-raccolta come la butte-

ratura amara, la plara, il disfacimento interno, il riscaldamento, ecc. (tab. 1). Infatti a dispetto della disponibilità nel terreno, spesso il Ca viene accumulato nel frutto in quantità sotto-ottimali, compromettendone la conservabilità. In questi casi si rende necessario intervenire con specifici programmi di concimazione fogliare con Ca basandosi su stime predittive in relazione alle cultivar, alle annate ed alle analisi dei frutti (Porro *et al.*, 2006).

Va inoltre ricordato che gli alberi possono beneficiare dell'assorbimento fogliare di molecole organiche di piccole dimensioni come aminoacidi e peptidi che, oltre a determinare un miglioramento dello stato nutrizionale, possono permettere il superamento di temporanei stati di stress abiotici (Ciavatta, 2006), promuovere lo sviluppo dell'albero (effetto biostimolante) attraverso meccanismi ancora non completamente conosciuti. È il caso degli acidi umici (Neri *et al.*, 2002), degli estratti di alghe (Norrie *et al.*, 2002), degli idrolizzati proteici di origine animale (Quartieri *et al.*, 2002) e dei cosiddetti rizobatteri promotori di crescita (PGPR), detti anche biofertilizzanti, una categoria senza dubbio innovativa che esplica la sua azione prevalentemente nella rizosfera (Vessey, 2003). Tuttavia, recentemente è stato dimostrato un positivo effetto anche a seguito di somministrazioni fogliari (Pirlak *et al.*, 2007). L'azione benefica di tali batteri (appartenenti soprattutto al genere *Bacillus* e *Pseudomonas*) sarebbe determinata dalla produzione di fitoregolatori come le auxine, le citochinine in grado di migliorare l'attività fotosintetica, lo sviluppo dei germogli e la concentrazione fogliare dei nutrienti.

### Fattori che influenzano l'assorbimento fogliare

L'assorbimento fogliare è influenzato da diversi fattori tra cui l'ambiente, il genotipo, la fase fenologica, lo stato fisiologico e nutrizionale dell'albero, la tecnica di applicazione, la natura chimica del composto, e le loro interazioni. L'anatomia della foglia (fig. 1) e la composizione chimica della superficie fogliare sono l'espressione genica che maggiormente influenza la ritenzione idrica della soluzione applicata, che infatti aumenta in presenza di microrugosità della superficie, di tricomi e in assenza di cere; per questo motivo le foglie giovani sono in genere più efficienti di quelle adulte nell'assorbimento dei nutrienti (Toselli *et al.*, 2004). D'altra parte nelle foglie mature spesso gli stomi perdono efficienza, non si aprono completamente o si occludono con conseguente riduzione dell'assorbimento dei nutrienti.

La pagina inferiore delle foglie, in genere più ricca di stomi (fig. 2), risulta la più adatta all'assorbimento

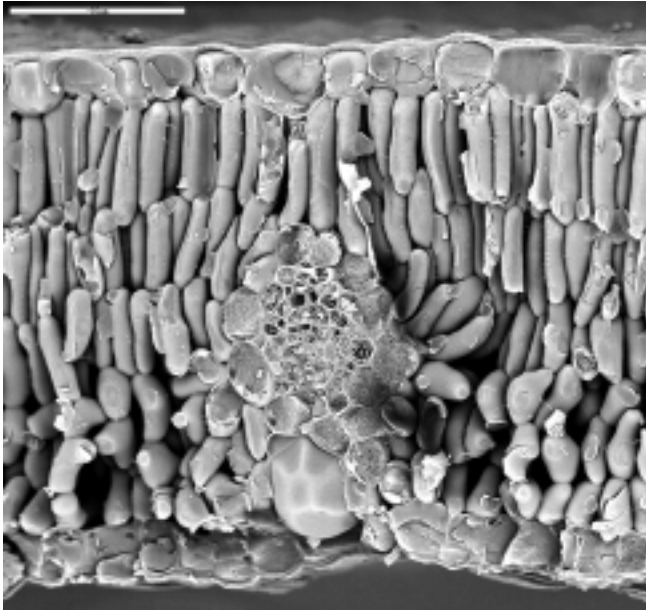


Fig. 1 - Organizzazione dei tessuti di una foglia di pesco vista in sezione trasversale (foto Fernandez).

*Fig. 1 - Tissue organization as observed in a peach leaf cross section.*

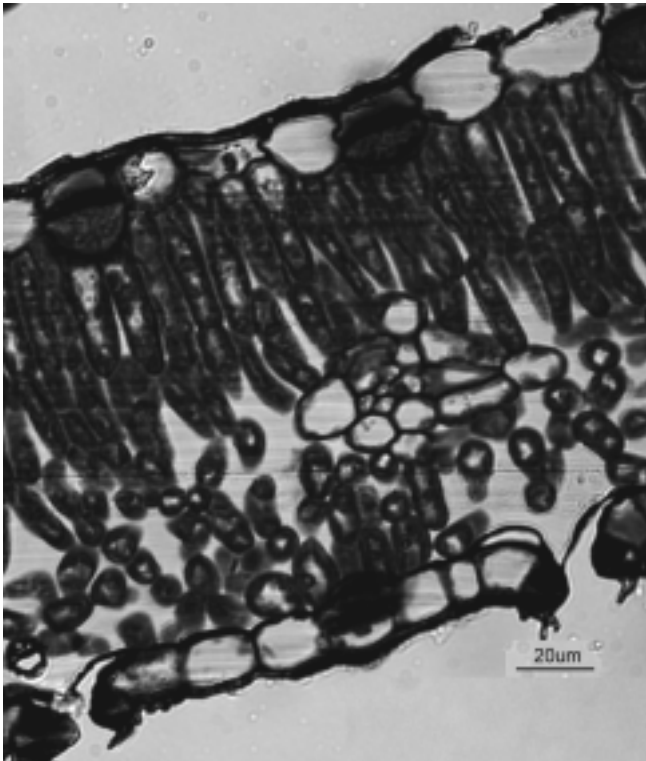
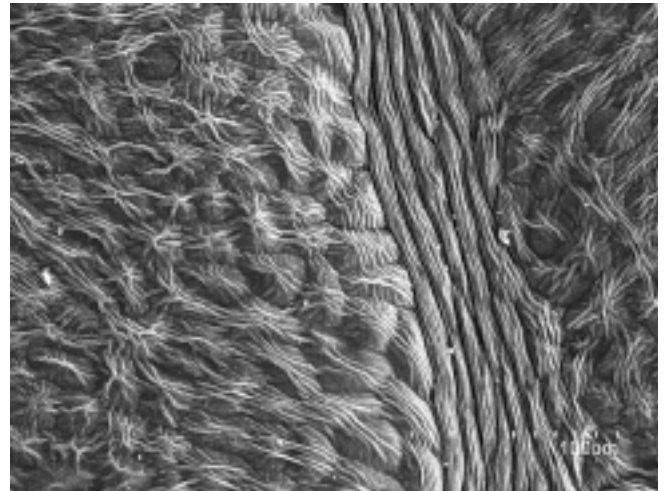


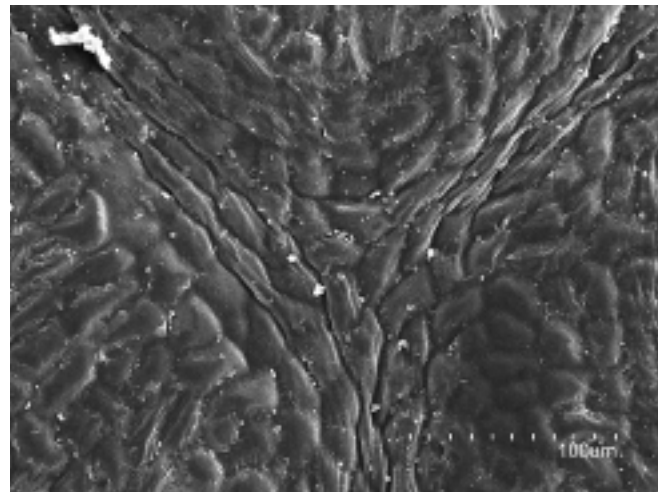
Fig. 2 - Sezione trasversale di foglie di pesco. La pagina inferiore presenta la maggiore concentrazione di soluzioni di continuità della cuticola rispetto a quella superiore (foto Fernandez).

*Fig. 2 - Cross section of a peach leaf. The abaxial (lower) leaf surface presents a higher concentration of cuticle interruptions than the adaxial (upper) leaf surface.*

fogliare. Condizioni di carenza di nutrienti possono determinare modifiche morfologiche e strutturali della superficie fogliare con conseguenze sull'assorbimento fogliare. La superficie di foglie clorotiche di pero e



Fe-carenti (Fe-deficiency)



Fe-ottimali (optimal Fe status)

Fig. 3 - Pagina superiore di foglie di pesco con sintomi di Fe-carenza (sopra) e in condizioni ottimali di Fe (foto Fernandez).  
*Fig. 3 - Adaxial peach leaf surface affected (upper) or not affected (lower) by Fe-deficiency.*

pesco, ad esempio, appare meno liscia (fig. 3), con una cuticola più sottile (Fernandez *et al.*, 2008), per le modifiche strutturali delle cere cuticolari, la presenza di cellule epidermiche più larghe di circa il 20% e di cellule di guardia più piccole. Nonostante la densità degli stomi resti inalterata, la loro dimensione tende a diminuire probabilmente a causa del minore sviluppo fogliare in condizioni di carenza di Fe. Queste modifiche comportano un aumento della permeabilità delle foglie clorotiche e una riduzione dell'efficienza dell'uso dell'acqua, a causa della maggiore traspirazione (Hutchinson, 1970; Anderson, 1984). In queste condizioni l'albero tende a chiudere parzialmente gli stomi (Shimshi, 1967) con conseguente riduzione dell'attività fotosintetica.

Tra i fattori ambientali che influenzano l'assorbimento fogliare, l'elevata umidità relativa (RH) favori-

sce la penetrazione dei nutrienti ionici in quanto riduce le proprietà idrofobiche della cuticola, amplifica il diametro dei pori, ritarda la disidratazione delle gocce irrorate, mantiene il deposito salino idratato e ne permette una rapida dissoluzione (Currier e Dybing, 1959; Schönherr, 2001). Studi condotti sulla capacità di penetrazione di diversi composti a base di Fe attraverso la membrana cuticolare di foglie di pioppo prive di stomi hanno mostrato la scarsa penetrazione in condizioni di RH < 95% (Schönherr *et al.*, 2005), lasciando intendere la completa inefficacia dei trattamenti fogliari a base di Fe in ambiente arido e semiarido. Tale risposta è stata probabilmente determinata dalla particolarità della specie esaminata, in quanto l'efficacia di formulati a base di Fe nella cura della clorosi ferrica è stata ripetutamente dimostrata in agrumi, pero, pesco, melo, mango, susino e mandorlo anche con valori di RH compresi tra 30 e 60% (Fernandez *et al.*, 2006).

La radiazione luminosa svolge in genere un effetto positivo sull'assorbimento fogliare, favorendo l'apertura degli stomi, l'attività fotosintetica e la permeabilità della cuticola in prossimità delle cellule di guardia (Currier e Dybing, 1959; Jyung e Wittwer, 1964). L'assorbimento nel simplasto dello ione  $\text{Fe}^{2+}$ , ad esempio, è preceduto da una riduzione, luce dipendente, del  $\text{Fe}^{3+}$  ad opera dell'enzima ferro chelato riduttasi. La radiazione luminosa, promuovendo l'assorbimento di Fe, contribuisce al mantenimento di un gradiente positivo verso il parenchima fogliare. Radiazioni luminose troppo intense possono, invece, rivelarsi negative in quanto favoriscono un maggiore ispessimento della cuticola, con aumento dello strato impermeabile e, con esso, della potenziale barriera alla penetrazione dei nutrienti.

L'effetto benefico delle temperature relativamente elevate non è in genere diretto, ma è legato all'aumento della fluidità delle cere della cuticola, che conseguentemente migliora il movimento dei soluti apolari.

L'aggiunta di surfatanti alla soluzione fertilizzante migliora la bagnatura della superficie fogliare in quanto riduce la tensione superficiale delle goccioline e aumenta l'angolo di contatto con la superficie bagnata; è stato, infatti, dimostrato che un liquido con una tensione superficiale < 30 mN m<sup>-1</sup> entra spontaneamente nello stoma (Leece, 1976). L'effetto dei surfatanti, capaci inoltre di aumentare la permeabilità delle cere esterne, varia in funzione della loro natura chimica (Schönherr, 2002). Ad esempio, la penetrazione del  $\text{CaCl}_2$  viene aumentata di 12 volte utilizzando un bagnante tipo alchil poliglucoside (0,2 g l<sup>-1</sup>), mentre viene ridotta da surfatanti proteici o a base di chelati sintetici (EDTA) (Swietlik e Faust, 1984).

In ambienti aridi o sub-aridi, al fine di migliorare l'efficacia di penetrazione dei fertilizzanti fogliari, è importante utilizzare un umettante igroscopico, in grado di favorire l'idratazione del composto fertilizzante (Schönherr *et al.*, 2005). Va comunque sottolineata l'impossibilità di prevedere la natura delle interazioni tra un composto fertilizzante ed un bagnante; nel caso del Fe-EDTA, ad esempio, l'impiego di surfatanti sembra garantire un migliore assorbimento fogliare (Neumann e Prinz, 1975). Il Fe-EDTA è comunque in grado di ionizzare il surfatante apolare, grazie al contributo dello ione  $\text{Cl}^-$  che deriva dal processo di preparazione del Fe-chelato, ottenuto miscelando  $\text{FeCl}_3$  (più raramente  $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) con  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Come conseguenza il surfatante diventa un elettrolita con carica negativa.

Una volta raggiunta la superficie fogliare, la velocità di penetrazione del sale è piuttosto elevata, in quanto è massimo il gradiente di concentrazione tra esterno (apoplasto) ed interno (simplasto) della foglia; successivamente la velocità tende a diminuire fino a stabilizzarsi con il tempo. Ad esempio, in presenza di una RH del 90%, circa la metà del Ca (somministrato alla concentrazione di 6 g l<sup>-1</sup>) viene assorbito dalle foglie di pero durante le prime 18 ore dall'applicazione, mentre l'assorbimento si completa nel giro di circa 100 ore (Schönherr, 2002). Tra i formulati a base di N, l'urea è la più veloce ad essere assorbita: circa il 50%, infatti, penetra le foglie di melo nelle prime 30-50 ore, mentre l'assorbimento totale si completa entro 5 giorni (Toselli *et al.*, 2004). Sempre in foglie di melo, l'efficacia di penetrazione dei composti a base di P è la seguente:  $\text{H}_3\text{PO}_4 > \text{K}_2\text{HPO}_4 > \text{NaH}_2\text{PO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  (Yogarathnam *et al.*, 1981).

Il pH della soluzione influenza la velocità di penetrazione in funzione del prodotto somministrato: pH acidi sono più indicati per i metalli (Fe e Zn), un pH compreso tra 5,4 e 6,6 si è dimostrato ottimale per l'urea, mentre il fosfato di K sembra penetrare con più facilità a pH superiore a 7.

Riguardo la natura chimica del composto, sostanze con elevato grado di igroscopicità e punto di deliquescenza (POD) inferiore al valore di RH dell'aria restano continuamente in soluzione e per questo penetrano più facilmente attraverso i pori della cuticola fogliare. Il POD è il valore minimo di RH al quale un sale si idrata e ritorna in soluzione acquosa. In generale poi l'entrata dei nutrienti nella foglia è tanto più rapida quanto minore è la loro dimensione molecolare. Studi recenti condotti sui fertilizzanti a base di Fe, costituiti prevalentemente da soluzioni acquose di chelati sintetici o di sali minerali, con raggio medio

(0,5 - 1,3 nm) inferiore a quello delle aperture stomatiche (20-30  $\mu\text{m}$  in pero e pesco), hanno tuttavia confutato i principi base della penetrazione attraverso la cuticola, dimostrando come la dimensione molecolare del composto chimico e la sua concentrazione nella soluzione non influenzino il suo assorbimento fogliare (Fernandez, 2004; Fernandez *et al.*, 2005 e 2006; Schönherr *et al.*, 2005). Tale comportamento, osservato anche per altri nutrienti (Tuckey *et al.*, 1961) come ad esempio il K (Chamel, 1996) e per molecole organiche quali il 2,4-D (Liu, 2004), sembra legato alle possibili interazioni tra il composto chimico e i pori cuticolari che possono saturarsi e/o ridursi di diametro (Schönherr *et al.*, 2005). Nello specifico, lo ione  $\text{Fe}^{3+}$  proveniente dall'idrolisi del cloruro di ferro, si lega ai gruppi carbossilici della cuticola (Weichert e Knoche, 2006).

### Meccanismi di assorbimento dei nutrienti da parte della foglia

La capacità delle foglie di scambiare acqua e soluti con l'ambiente circostante è nota da più di tre secoli (Franke, 1986). Infatti, nonostante la foglia sia interamente ricoperta di cuticola (costituita da cutina e cere) che ne limita la perdita di acqua (Schönherr, 2006), l'assorbimento di molecole chimiche attraverso la superficie fogliare è reso possibile dalla presenza, soprattutto negli strati interni, di emicellulosa, di composti pectinacei, di microfibrille polisaccaridi, di gruppi polari ( $\text{COOH}^-$ ,  $\text{OH}^-$ , esteri, ecc.) che, insieme, conferiscono agli strati amorfi idrofilia e permeabilità (Franke, 1967). Questi composti possono formare pori idratati che mettono in collegamento la superficie esterna della foglia con la parete cellulare dell'epidermide (fig. 4). Sulla superficie fogliare sono presenti anche soluzioni di continuità, ovvero imperfezioni della cuticola e aree con limitata presenza di cere come le aperture stomatiche, i tricomi e le cellule specializzate dell'epidermide fogliare (Tukey *et al.*, 1961) che insieme concorrono a creare le condizioni per l'assorbimento fogliare dei composti chimici.

Recentemente Schönherr (2006) ha suggerito l'esistenza di due distinte vie di penetrazione della cuticola da parte dei nutrienti. La prima interessa le molecole neutre (apolari), come ad esempio l'urea e l'acido borico, che attraverserebbero la cuticola per diffusione, dissolvendosi nell'ambiente lipofilo delle cere della cuticola vera e propria, in maniera inversamente proporzionale al loro peso molecolare. La seconda via di penetrazione interessa invece le specie ioniche solubili in acqua che si muoverebbero attraverso i pori idratati della cuticola (Schönherr, 1976) e attraverso

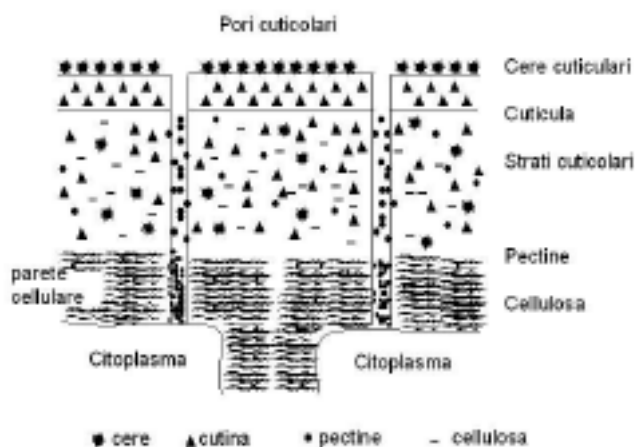


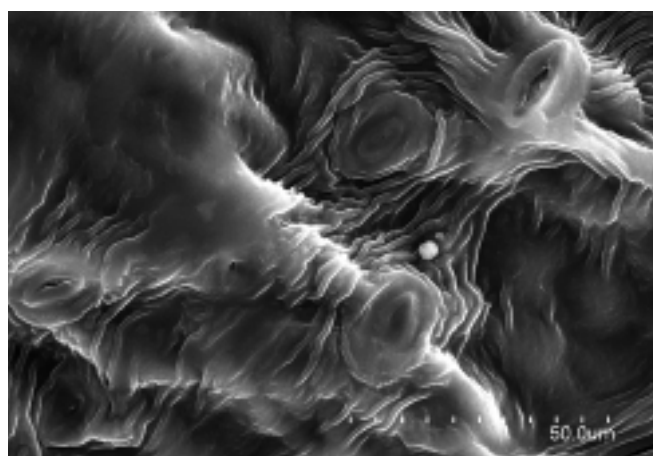
Fig. 4 - La superficie fogliare è ricoperta da una miscela di cere, pectine e cellulosa semi-organizzati in diversi strati. La frazione idrofila (pectine) forma pori cuticolari che permettono la penetrazione di composti solubili in acqua (modificata da Marschner, 1995).

*Fig. 4 - Leaf surface is a mix of wax (jagged symbols), cutin (triangles), pectin (dots), and cellulose (dashed line) arranged in different layers. The hydrophilic fraction (pectin) may form pores that allow a penetration of water-soluble compounds.*

gli spazi casuali che si formano tra le molecole idrofobe (Luque *et al.*, 1995). I pori presentano un raggio che oscilla tra 0,3 nm (nelle foglie di edera) e 1,2 nm (nei frutti di pomodori) (Schönherr, 2006), una densità di circa  $10^{10}$  pori per  $\text{cm}^2$  e un'elevata dinamicità, che li fa allargare e restringere in funzione dell'RH dell'aria (Eichert e Burkhardt, 2001). La penetrazione degli ioni attraverso la cuticola (Schönherr, 2001) avviene prevalentemente per diffusione (grazie al gradiente di concentrazione tra l'esterno e l'interno della foglia) e, infatti, per mantenere l'equilibrio elettrostatico, cationi ed anioni penetrano in quantità equivalenti.

### Il ruolo delle aperture stomatiche

L'importanza dell'assorbimento di nutrienti attraverso le aperture stomatiche (fig. 5) non è ancora del tutto chiaro (Eichert *et al.*, 2006), tuttavia la regione peristomatale della foglia risulta particolarmente adatta alla penetrazione di composti polari ed apolari in quanto possiede uno strato cuticolare molto sottile e permeabile, in confronto alle aree prive di stomi, tanto che l'assorbimento attraverso le aperture stomatiche assomiglia più ad una diffusione nel mezzo acquoso (Eichert *et al.*, 2006), che ad un passaggio attraverso i pori della cuticola. Il significativo coinvolgimento degli stomi nell'assorbimento fogliare è indirettamente confermato dal positivo effetto che la radiazione luminosa svolge sulla penetrazione dei nutrienti (che probabilmente traggono vantaggio dalla maggiore apertura stomatica) e dalla maggiore efficacia di

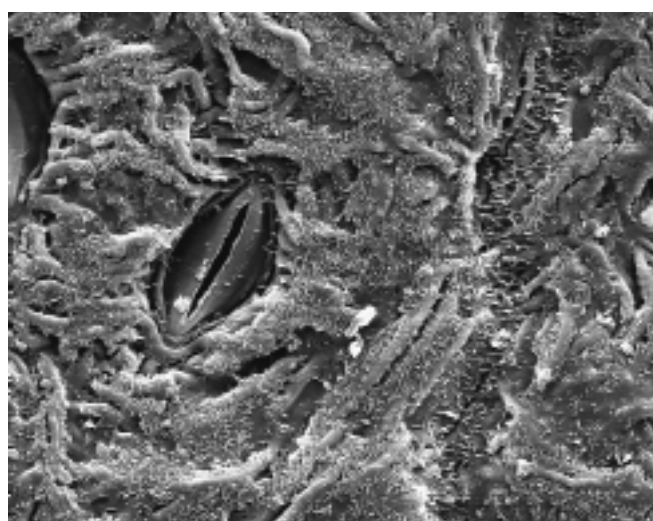


A - ciliegio (cherry)



1000x, 9mm, 10kV, 4/7/05, UpPearleaf-Fe04

B - pesco (peach)



1000x, 9mm, 10kV, 4/7/05, UpPearleaf+Fe02

C - pero (pear)

Fig. 5 - Particolare di aperture stomatiche nella pagina inferiore di foglie di ciliegio (A), pesco (B) e pero (C) (foto Fernandez).  
Fig. 5 - Stomata of the abaxial (lower) surface of cherry (A), peach (B) and pear (C) leaves.

assorbimento della pagina inferiore della foglia (più ricca di stomi). La camera sottostomatica, sempre idratata e con una bassissima concentrazione di cere, costituisce la via più agevole di penetrazione dei composti chimici che in tale ambiente possono restare a lungo in soluzione (Norris e Bukovac, 1968). Non tutte le aperture stomatiche partecipano allo stesso modo all'assorbimento fogliare; infatti, prove sperimentali condotte su *Allium porrum*, *Commelina communis* e *Sedum telephium* (Eichert e Burkhardt, 2001) hanno mostrato che solo il 10% degli stomi partecipa all'assorbimento di  $Fe^{3+}$ . Questo comportamento dipende dalle proprietà chimiche della cutina che ricopre la camera stomatica, dalla tensione superficiale della soluzione irrorata, dalla geometria e bagnabilità dell'apertura stomatica e dall'angolo di contatto tra la goccia d'acqua e la superficie della cuticola (Eichert e Burkhardt, 2001). Infatti, quando l'angolo di contatto della goccia con lo stoma è minore dell'angolo della parete dell'apertura stomatica, allora l'infiltrazione della goccia all'interno dello stoma avviene spontaneamente (Schönherr e Bukovac, 1972). La bagnabilità della superficie fogliare, ovvero la sua capacità di trattenere la soluzione acquosa, può essere modificata dalla presenza di microorganismi che popolano la fillosfera, ovvero l'interfaccia foglia-atmosfera (Schreiber, 1996) e che possono, unitamente ad impulsi ambientali e fisiologici, favorire l'apertura degli stomi e promuovere l'assorbimento ionico (Eichert *et al.*, 1998). Il contributo degli stomi sembra essere massimo quando la foglia è ricoperta da un sottile film liquido rispetto a quando si è in presenza di tante piccole gocce. Se si considera che spesso le cellule di guardia e quelle accessorie presentano pori in abbondanza, si comprende come la penetrazione dei composti chimici sia massima nelle foglie ad elevata densità di aperture stomatiche. È il caso della vite, che presenta aperture stomatiche molto frequenti (circa 800 per  $mm^2$  di superficie fogliare) (Fregoni, 1998 e letteratura ivi citata).

### Utilizzo dei nutrienti assorbiti per via fogliare

Una volta attraversata la cuticola e raggiunto l'apoplasto del mesofillo fogliare, i nutrienti oltrepassano la membrana citoplasmatica e si riversano nel citoplasma per partecipare al metabolismo della pianta. Nel caso dell'urea, una volta nel citosol, essa viene rapidamente idrolizzata dalla ureasi e lo ione ammonio ( $NH_4^+$ ) viene metabolizzato nel processo glutamato-ossiglutarato-aminotrasferasi (GOGAT). Gli ioni, assorbiti per via fogliare, giunti nello spazio libero del mesofillo fogliare si mescolano con gli ioni prove-

nienti dalla radice e a quelli rimobilizzati internamente all'albero, per essere poi assorbiti attivamente dalle cellule, grazie all'intervento di specifici trasportatori o canali di membrana. Con il passaggio degli ioni nel simplasto e la conseguente diminuzione di concentrazione nell'apoplasto, viene mantenuto un gradiente tra parte esterna ed interna della cuticola e garantita la conseguente penetrazione passiva dei nutrienti. Le caratteristiche fisico-chimiche dell'ambiente apoplastico influenzano l'assorbimento di alcuni ioni come ad esempio il  $\text{Fe}^{3+}$ , che per essere assorbito dalla membrana citoplasmatica deve essere ridotto a  $\text{Fe}^{2+}$ . Tale riduzione è influenzata dal pH e dagli acidi organici presenti nell'apoplasto; ne consegue che se l'ambiente non è sufficientemente riducente, il Fe si accumula nell'apoplasto senza essere assorbito. È evidente quindi che l'efficacia di un formulato fogliare a base di Fe dipende dalle condizioni fisiologiche della foglia; ad esempio l'abbassamento del pH della soluzione irrorata permette al  $\text{Fe}^{3+}$ , eventualmente accumulato nell'apoplasto, di essere assorbito con conseguente rinverdimento delle foglie clorotiche (Tagliavini *et al.*, 1995).

Nel caso di nutrienti caratterizzati da elevata mobilità floematica (N, K, P, B, ecc.), il loro utilizzo può avvenire anche in tessuti diversi da quelli irrorati, come ad esempio in organi riproduttivi o di riserva. La quantità di nutrienti mobilizzati dipende dallo stadio fenologico dell'albero, nonché dalla presenza di sinks. Uno studio recente circa l'applicazione fogliare di urea su mandarino (Ishikawa *et al.*, 2008) ha confermato che la maggior parte dell'N applicato per via fogliare durante la fase di intensa crescita vegetativa si muove prevalentemente verso organi di recente costituzione; negli alberi a foglia caduca a fine stagione, invece, una significativa porzione di N derivante da somministrazioni fogliari è mobilizzata negli organi legnosi prima della senescenza fogliare. Dati sperimentali riportano valori di circa l'80-87% nel ciliegio e 50-60% nel melo e nel pesco (Weinbaum *et al.*, 2002). L'N distribuito in primavera-estate viene, invece, esportato in funzione delle richieste degli organi in attiva crescita (frutti, germogli e radici).

Anche i tempi di traslocazione degli elementi assorbiti dipendono dall'età fogliare: ad esempio il processo di traslocazione dalle foglie ai frutti risulta più efficace per le foglie giovani, come osservato da Fortunati *et al.* (2004) per gli elementi cesio e stronzio in fragola.

Altri nutrienti (Ca, Fe, Zn, Mn, ecc.) sono pressoché immobili per cui il loro effetto benefico è limitato alla zona di applicazione della soluzione fertilizzante. Nel caso dello Zn, solo il 7% della dose applicata a

fine estate sulla lamina fogliare del pesco è stato poi ritrovato negli organi legnosi dopo la caduta delle foglie (Sanchez *et al.*, 2006). Una volta entrato nell'albero, tuttavia, lo Zn risulta piuttosto mobile ed in grado di distribuirsi in tutti i distretti dello scheletro, incluse le radici e una quota superiore al 50% può accumularsi nei germogli di neo formazione (Sanchez *et al.*, 2006).

Nel caso del B, la mobilità è legata alla capacità della pianta di sintetizzare zuccheri alcoolici, come sorbitolo, prodotto dal metabolismo delle Rosacee per il trasporto floematico del carbonio, che ne giustifica l'impiego in post-raccolta (tab. 1).

## Conclusioni

La concimazione fogliare presenta numerosi vantaggi rispetto alla concimazione al suolo, principalmente legati alla elevata efficienza con cui gli elementi nutritivi sono assorbiti ed alla velocità con cui essi raggiungono gli organi con sintomi di carenza, quali le foglie, i fiori e i frutti. Essa può quindi essere considerata non solo una tecnica di soccorso, in grado di soddisfare richieste specifiche di elementi nutritivi in particolari fasi fenologiche e in alcuni organi della pianta, ma anche come una parte integrante della ordinaria gestione dei nutrienti nel frutteto, al fine di limitare significativamente sprechi e rischi di inquinamento. È bene in ogni caso intervenire solo in presenza di reali condizioni di necessità, utilizzando formulati di comprovata qualità e titolazione nota. In ogni caso la fertilità (chimica, fisica e biologica) del terreno deve essere preservata ed implementata, in quanto solo da un equilibrato sviluppo della parte ipogea e di quella epigea possono scaturire le condizioni per una produzione costante e di qualità con il minimo impiego di energia.

## Riassunto

Lo strato impermeabile (cuticola), composto da cutina e cere, che ricopre la foglia presenta aperture stomatiche, tricomi e soluzioni di continuità che rendono possibile l'assorbimento di composti chimici, secondo due probabili vie di penetrazione, una per le molecole neutre solubili nell'ambiente lipofilo della cuticola e una per i soluti polari che si dissociano in acqua. La pratica della concimazione fogliare, efficace solo in presenza di carenze di nutrienti, ha effetto se il fertilizzante è in forma assimilabile, se gli organi bersaglio trattengono i nutrienti (ritenzione), che devono essere assorbiti ed eventualmente mobilizzati verso la zona di carenza. Si presta per apportare



micronutrienti quali Fe, Mn, Zn, B, ecc. o nei casi di condizioni climatiche, agronomiche o fisiologiche dell'albero che limitano la capacità di assorbimento radicale (es. N, Ca, K, Mg). La penetrazione dei nutrienti è favorita da elevata umidità relativa, radiazione luminosa, temperature miti, alcuni surfattanti. L'assorbimento del sale irrorato avviene passivamente per l'elevato gradiente di concentrazione tra apoplasto e simplasto della foglia. Fa eccezione il Fe<sup>3+</sup>, che viene assorbito attivamente previa riduzione a Fe<sup>2+</sup>.

**Parole chiave:** aperture stomatiche, clorosi ferrica, cuticola fogliare, fertilizzanti, Macronutrienti

Lavoro finanziato dalla Commissione Europea (ISAFRUIT Project, Thematic Priority 5-Food Quality and Safety, of the 6th Framework Programme of RTD; Contract No. FP6-FOOD-CT-2006-016279).

## Bibliografia

- ALVAREZ-FERNANDEZ A., ABADIA J., ABADIA A., 2006. *Iron deficiency, fruit yield and quality*. In: (Abadia J. e Barton L.L. Eds.) "Iron Nutrition plants and rhizospheric microorganism", Springer, Dordrecht, The Netherlands: 85-101.
- ANDERSON C.A., 1984. *Development of leaf water deficits in detached green and lime-chlorotic leaves of seedlings from populations of Eucalyptus obliqua L'Hérit.* Plant and Soil, 77: 171-181.
- BAVARESCO L., 2002. *Sensibilità dei vitigni alla clorosi ferrica da calcare*. Phytomagazine, Speciale Ferro, 1(1): 7-17.
- CHAMEL A., 1996. *Foliar uptake of chemicals studied with whole plants and isolated cuticles*. In: (Neumann P.M. Ed.) "Plant growth and leaf-applied chemicals", CRC Press Boca Raton, FL, USA: 27-48.
- CIAVATTA C., 2006. *Fertilizzanti per una gestione sostenibile delle colture arboree da frutto*. Italus Hortus, 3: 40-45.
- CURRIER H.B., DYBING C.D., 1959. *Foliar penetration of herbicides. Review and present status*. Weeds, 7: 195-213.
- EICHERT T., BURKHARDT J., 2001. *Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system*. J. Exp. Bot., 357: 771-781.
- EICHERT T., GOLDBACH H.E., BURKHARDT J., 1998. *Evidence for the uptake of large anions through stomatal pores*. Botanica Acta, 111: 461-466.
- EICHERT T., KURTZ A., GOLDBACH H., 2006. *Investigations on the contribution of the stomatal pathway to foliar uptake*. Acta Hort., 721: 307-312.
- FERNANDEZ V., 2004. *Investigations on Foliar Iron Application to Plants - A new approach*. Shaker Verlag, Aachen, Germany, 171 pp.
- FERNANDEZ V., DEL RIO V., ABADIA J., ABADIA A., 2006. *Foliar iron fertilization of peach (Prunus persica (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants*. Plant and Soil, 289: 239-252.
- FERNANDEZ V., EBERT G., 2005. *Foliar iron fertilization - a critical review*. J. Plant Nutr., 28: 2113-2124.
- FERNANDEZ V., EBERT G., WINKELMANN G., 2005. *The use of microbial siderophores for foliar iron application studies*. Plant and Soil, 272: 245-252.
- FERNÁNDEZ V., EICHERT T., 2009. *Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization*. Critical Reviews in Plant Sciences (in stampa).
- FERNANDEZ V., EICHERT T., DEL RIO V., LOPEZ-CASADO G., HEREDIA-GUERRERO J.A., ABADIA A., HEREDIA A., ABADIA J., 2008. *Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications*. Plant and Soil, 311 (1-2): 161-172.
- FORTUNATI P., BRAMBILLA M., SPERONI F., CARINI F., 2004. *Foliar uptake of <sup>134</sup>Cs and <sup>85</sup>Sr in strawberry as function by leaf age*. J. Env. Radioactivity, 71: 187-199.
- FRANKE W., 1967. *Mechanism of foliar penetration of solutions*. Annual Reviews of Plant Physiology, 18: 281-300.
- FRANKE W., 1986. *The basis for foliar absorption of fertilizers with special regards to the mechanisms*. In: (Alexander A. Ed) "Foliar Fertilization", Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 17-25.
- FREGONI M., 1998. *La nutrizione minerale della vite*. In: (Fregoni M. Ed.) "Viticoltura di qualità", Stampa Grafiche Lama, Piacenza: 493-578.
- FREGONI M., 2000. *Potenzialità dell'assorbimento fogliare della vite*. Inf. Agr., 17: 63-64.
- HUTCHINSON T.C., 1970. *Lime chlorosis as a factor in seedling establishment on calcareous soils. II. The development of leaf water deficits in plants showing lime-chlorosis*. New Phytol., 69: 143-157.
- ISHIKAWA K., KIMURA H., YOSHIKAWA S., 2008. *Absorption and translocation of foliar applied urea in Satsuma mandarin during the sprouting stage - Effect of number of applications and of the combination with petroleum oil emulsion*. Hort. Res. (Japan), 7 (1): 39-46.
- JYUNG W.H., WITTWER S.H., 1964. *Foliar absorption - an active process*. Am. J. Bot., 51: 437-444.
- LEECE D.R., 1976. *Composition and ultrastructure of leaf cuticle from fruit trees, relative to differential foliar absorption*. Austr. J. Plant Physiology, 3: 833-847.
- LIU Z., 2004. *Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides - a complex scenario*. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 35: 149-153.
- LUCENA J.J., 2006. *Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants*. In: (Abadia J., Barton L.L. Eds.) "Iron Nutrition plants and rhizospheric microorganism", Springer, Dordrecht, The Netherlands: 103-128.
- LUQUE P., GAVARA R., HEREDIA A., 1995. *A study of the hydration process of isolated cuticular membranes*. New Phytol., 129: 283-288.
- MARSCHNER H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- NERI D., LODOLINI E.M., SAVINI G., SABBATINI P., BONANOMI G., ZUCCONI F., 2002. *Foliar application of humic acids on strawberry (cv Onda)*. Acta Hort., 594: 297-302.
- NEUMANN M., PRINZ R., 1975. *The reduction by surfactants of leaf burn resulting from foliar sprays and a salt-induced inhibition of the effect*. J. Sci. Food Agric., 26: 909-914.
- NORRIE J., BRANSON T., KEATHLY P.E., 2002. *Marine plant extracts impact in grape yield and quality*. Acta Hort., 594: 315-319.
- NORRIS R.F., BUKOVAC M.J., 1968. *Structure of the pear leaf cuticle with special reference to cuticular penetration*. Am. J. Bot., 55: 975-983.
- PIRLAK L., TURAN M., SAHIN F., ESITKEN A., 2007. *Floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to apples increases yield, growth, and nutrient element contents of leaves*. J. Sustainable Agriculture, 4: 145-155.
- PONI S., QUARTIERI M., TAGLIAVINI M., 2003. *Potassium nutrition of Cabernet Sauvignon grapevines (Vitis vinifera L.) as affected by shoot trimming*. Plant and Soil, 253(2): 341-35.

- PORRO D., CESCHINI A., PANTEZZI T., 2006. *The importance of advisory service in predicting bitter pit using early-season fruit analysis*. Acta Hort., 721: 273-277.
- QUARTIERI M., LUCCHI A., MARANGONI B., TAGLIAVINI M., CAVANI L., 2002. *Effects of the rate of protein hydrolysis and spray concentration on growth of potted kiwifruit (Actinidia deliciosa) plants*. Acta Hort., 594: 341-347.
- ROMBOLÀ A.D., TAGLIAVINI M., 2006. *Iron nutrition of fruit tree crops*. In: (Abadía J., Barton L.L. Eds.) "Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms", Springer, Dordrecht, The Netherlands: 61-83.
- SANCHEZ E.E., WEINBAUM S.A., JOHNSON R.S., 2006. *Comparative movement of labelled nitrogen and zinc in 1-year-old peach [Prunus persica (L.) Batsch] trees following late-season foliar application*. J. Hort. Sci. & Biotech., 5: 839-844.
- SCHÖNHERR J., 1976. *Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores*. Planta, 128: 113-126.
- SCHÖNHERR J., 2001. *Cuticular penetration of calcium salts: effect of humidity, anions and adjuvants*. J. Plant Nutrition Soil Science, 164: 225-231.
- SCHÖNHERR J., 2002. *Foliar nutrition using inorganic salts: law of cuticular penetration*. Acta Hort., 594: 77-84.
- SCHÖNHERR J., 2006. *Characterisation of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes*. J. Exp. Bot., 57: 2471-2491.
- SCHÖNHERR J., BUKOVAC M. J., 1972. *Penetration of stomata by liquids. Dependence on surface tension, wettability, and stomatal morphology*. Plant Physiology, 49: 813-819.
- SCHÖNHERR J., FERNANDEZ V., SCHREIBER L., 2005. *Rates of cuticular penetration of chelated FeIII: role of humidity, concentration, adjuvant, temperature and type of chelate*. J. Agric. Food Chem., 53: 4484-4492.
- SCHREIBER L., 1996. *Wetting of the upper needle surface of Abies grandis: influence of pH, wax chemistry and epiphyllic microflora on contact angles*. Plant Cell and Environment, 19: 455-463.
- SCUDELLARI D., TAGLIAVINI M., 2000. *Una concimazione ragionata*. Il Divulgatore, 2: 37-48.
- SHIMSHI, D., 1967. *Leaf chlorosis and stomatal aperture*. New Phytol., 66: 455-461.
- SWIETLIK D., FAUST M., 1984. *Foliar Nutrition of Fruit Crops*. In: (Janick J. Ed.) "Horticultural Reviews", vol. 6 AVI Publishing Company Inc., Westport, CT, USA: 287-355.
- TAGLIAVINI M., SCUDELLARI D., MARANGONI B., TOSELLI M., 1995. *Acid-spray greening of kiwifruit leaves affected by lime-induced iron chlorosis*. In: (Abadía J. Ed.) "Iron Nutrition in soils and plants", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 191-195.
- TAGLIAVINI M., TOSELLI M., 2005. *Foliar applications of nutrients*. In: Encyclopaedia of Soils in the Environment (D. Hillel Ed.). Elsevier Ltd., Oxford, U.K. pp. 53-60.
- TOSELLI M., FLORE J. A., MARANGONI B., MASIA A., 1999. *Effect of root-zone temperature on nitrogen accumulation by non-bearing apple trees*. J. Hort. Sci. Biotech., 74(1): 118-124.
- TOSELLI M., THALHEIMER M., TAGLIAVINI M., 2004. *Leaf uptake and tree partitioning of urea-N as affected by concentration and volume of spray solution and leaf age of apple trees*. J. Hort. Sci. Biotech., 79(1): 97-100.
- TUKEY H. B., WITTEWIT S. H., BUKOVAC M. J., 1961. *Absorption of radionuclides by aboveground plant parts and movements within the plant*. J. Agr. Food Chem., 54: 6809-6813.
- VESSEY K.J., 2003. *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant and Soil 255: 571-586.
- WEICHERT H., KNOCH M., 2006. *Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface. II. FeCl<sub>3</sub> decreases water permeability of polar pathways*. J. Agric. Food Chem., 54: 6294-6302.
- WEINBAUM S.A. 1988. *Foliar nutrition in fruit trees*. In: (Neumann P.E. Ed.) "Plant Growth and Leaf-Applied Chemicals", CRC Press, Boca Raton, FL, USA: 81-100.
- WEINBAUM S.A., BROWN P.H., JOHNSON R. S., 2002. *Application of selected macronutrients (N, K) in deciduous orchards: physiological and agro technical perspectives*. Acta Hort., 594: 59-64.
- YOGARATNAM N., ALLEN M., GREENHAM D.W.P., 1981. *The phosphorous concentration in apple leaves as affected by foliar application of its compounds*. J. Hort. Sci., 56: 255-260.