

## Colloqui molecolari fra radici e azoto fissatori

La crescita di tutti gli organismi viventi dipende dalla disponibilità di nutrienti minerali e fra questi l'azoto è certamente il più importante in quanto componente di proteine, acidi nucleici e altri costituenti cellulari. L'azoto atmosferico non è disponibile per essere utilizzato dalla maggior parte degli organismi viventi e perché ciò possa avvenire, deve essere fissato cioè ridotto in forma di ioni ammonio o nitrato. Nelle piante, in un ambiente con un clima e una disponibilità di acqua che siano compatibili con la vita, l'azoto è molto spesso il fattore limitante della crescita e produttività.

La maggior parte dell'azoto atmosferico viene convertito ad ammonio a opera di micro-organismi cosiddetti azoto-fissatori in un processo chiamato appunto fissazione dell'azoto. Tutti gli organismi azoto-fissatori sono procarioti e alcuni di loro vivono in forma libera mentre altri stabiliscono una intima simbiosi con piante o altri organismi.

Alcuni dei batteri "free living" in grado di fissare l'azoto atmosferico vivono comunque in stretta associazione con le radici di piante anche se non stabiliscono con esse un intimo rapporto di tipo simbiotico. È il caso ad esempio di *Azotobacter* e *Azospirillum* che sono in grado di fissare l'azoto quando crescono nella rizosfera di diverse piante. In entrambi questi casi i batteri utilizzano per la loro crescita zuccheri o altri nutrienti che vengono liberati nel terreno dalle radici. Recentemente è stato anche dimostrato che l'azoto fissato da questi organismi può essere trasportato all'interno della pianta che quindi può trarre un certo vantaggio da questo processo fissativo. In questi casi comunque il contributo che questi batteri riescono a dare al soddisfacimento dei bisogni nutrizionali azotati di una pianta è estremamente ridotto perché

\* Istituto di Genetica e Biofisica A. Buzzati Traverso, CNR, Napoli

la fissazione dell'azoto è un processo molto dispendioso e solo una piccola parte di nutrienti organici sono disponibili continuamente per i batteri della rizosfera. Questo tipo di limitazione viene superato nei batteri che vivono in associazione endo-simbiotica con le piante come nel caso delle associazioni simbiotiche fra leguminose e *rizobi*. È stato infatti stimato che per il normale svolgimento della fissazione dell'azoto da parte di un microrganismo, circa il 20% del fotosintato totale di una pianta leguminosa viene allocato al nodulo e utilizzato per tale processo.

Per lo stabilirsi della simbiosi il microsimbionte batterico deve avere accesso a singole cellule di pianta e allocarsi in compartimenti circondati da una membrana di origine vegetale all'interno dei quali sarà messo in grado di fissare l'azoto atmosferico.

Fra le associazioni simbiotiche oltre a quelle fra leguminose e *Rizobi* ve ne sono altre che sono condotte da batteri del gruppo degli actinomiceti (batteri filamentosi). Fra questi *Frankia* è in grado di formare noduli azoto-fissatori con piante legnose di differenti famiglie come *Alnus* e *Casuarina*. Un'altra associazione simbiotica è quella che avviene fra cianobatteri, batteri fotosintetici che possono vivere come organismi free living in habitat come quelli dei suoli desertici, o come simbionti con licheni in altri tipi di habitat.

Nel caso dell'associazione fra *Gunnera* e il cianobatterio *Nostoc*, quest'ultimo invade una ghiandola pre-esistente dove forma delle eterocisti nelle cellule infettate. Nella maggior parte delle altre interazioni simbiotiche, invece, come risultato della simbiosi si forma *ex novo* un organo specializzato, il nodulo radicale che è sviluppato in modo da garantire le condizioni ottimali per la fissazione dell'azoto da parte del batterio.

Dal punto di vista metabolico il significato di questa interazione simbiotica fra batteri del genere *Rhizobiaceae* e la famiglia delle piante leguminose, consiste in uno scambio fra l'azoto atmosferico ridotto dai batteri invasori e trasferito sotto forma di ammonio alla pianta e i prodotti del fotosintato che invece seguono il percorso opposto e vengono ceduti ai batteri in modo che essi possano svolgere la loro azione. Come si può immaginare un tale processo di organogenesi è finemente regolato e dal punto di vista dello sviluppo e da quello funzionale e a livello di espressione genica esiste un intero repertorio genico nella pianta che svolge un ruolo fondamentale in questo processo. Sono state identificate delle batterie di geni, noduline, che vengono indotte nel corso dell'interazione e specificamente espresse nel tessuto nodulare.

Il nodulo radicale è solo il risultato finale di un'interazione che ha inizio con una serie di eventi che fanno parte di una fitta rete di colloqui molecolari che

avvengono nella rizosfera. Questi colloqui molecolari permettono il riconoscimento reciproco dei due partners nella rizosfera e presumibilmente, includono anche il rilascio di segnali specifici da parte di entrambi i partners all'interno della radice, permettendo ad esempio la distinzione del simbionte *Rizobio* da altri patogeni invasori e quindi tutte le normali fasi di avanzamento dello sviluppo nodulare fino alla formazione del nodulo maturo azoto-fissatore. Mentre le fasi di riconoscimento reciproco che avvengono nella rizosfera e che sono necessarie e sufficienti per l'accensione del programma geneticamente controllato dalla pianta che porta all'organogenesi del nodulo sono stati elucidati in misura notevole negli ultimi anni, poco è ancora noto sui segnali che agiscono più a valle nel corso dell'interazione simbiotica.

In particolare, i colloqui molecolari fra i due partners simbiotici iniziano al momento del rilascio da parte delle radici di una serie di composti fenolici (flavonoidi) dalle differenti caratteristiche nelle differenti piante leguminose. Tali flavonoidi vengono recepiti dal batterio che cresce nella rizosfera e vanno a interagire con un macchinario trascrizionale di quest'ultimo che è deputato alla espressione dei geni codificanti i cosiddetti Fattori Nod. Tali fattori in forma purificata sono in grado di accendere, anche in assenza di *Rhizobium*, il programma genetico che conduce alla formazione del nodulo azoto-fissatore.

Questi fattori sono costituiti essenzialmente da uno scheletro di zuccheri (N-acetilglucosammina) dalla lunghezza variabile, con una catena di acidi grassi (di diversa lunghezza) legata allo zucchero non riducente che si trova a un'estremità della catena e vari tipi di gruppi sostituenti (sulfurilico, mannosilico, fucosilico, arabinosilico, ecc.) che si trovano invece all'altra estremità riducente della catena di N-acetilglucosammina. Quindi, anche tali fattori di sintesi batterica, così come i flavonoidi di origine vegetale, presentano differenze strutturali nei diversi ceppi di *Rhizobium* e queste specificità sono sicuramente un fattore fondamentale nel determinare la specie-specificità di questo tipo di interazione simbiotica. Con ciò si intende la condizione per cui determinati ceppi di *Rizobio* sono in grado di infettare solo determinate piante leguminose e viceversa.

L'avanzamento delle conoscenze è avvenuto innanzitutto grazie all'identificazione di alcuni sistemi modello nel campo delle leguminose (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*) che hanno consentito di accentrare gli sforzi dei ricercatori impegnati in questo campo e come conseguenza, la messa a punto di una serie di strumenti tecnici fra i quali sicuramente quelli per la mappatura e isolamento di geni responsabili di specifici fenotipi simbiotici. Quindi è stato possibile isolare un gran numero di mutanti nelle specie modello e caratterizzarli in maniera estremamente fine sia dal punto di vista molecolare (espressione di geni coinvolti nel processo simbiotico), citologico (analisi per

microscopia di fenotipi precoci come la deformazione del pelo radicale) e fisiologico (analisi dei flussi ionici coinvolti nelle fasi precoci dell'interazione).

La caratterizzazione fenotipica di tali mutanti (fig. 1) ha permesso di identificare una scala temporale di eventi cruciali per lo stabilirsi della simbiosi.

Successivamente, i geni responsabili di questi fenotipi sono stati identificati mediante *map positional cloning* e ciò ha consentito di ipotizzare *pathways* di trasduzione e possibili interazioni fra fattori coinvolti nella formazione del nodulo azoto-fissativo.

Un altro segnale di fondamentale importanza nell'instaurarsi dell'interazione simbiotica, anch'esso oggetto di studi approfonditi, è quello dell'azoto che non rappresenta solo, sotto forma di ammonio, il prodotto finale della fissazione dell'azoto che viene trasferito alla pianta nelle fasi tardive dell'interazione, ma è anche un importante regolatore della simbiosi in tutte le sue varie fasi. Infatti, in una pianta leguminosa cresciuta in presenza di azoto ridotto gli eventi di infezione e invasione delle radici da parte di *Rhizobium* abortiscono molto precocemente. Quindi il segnale azoto può essere recepito dal sistema radicale della pianta in maniera da regolare attraverso un *pathway* di trasduzione non ancora identificato il programma di sviluppo nodulare.

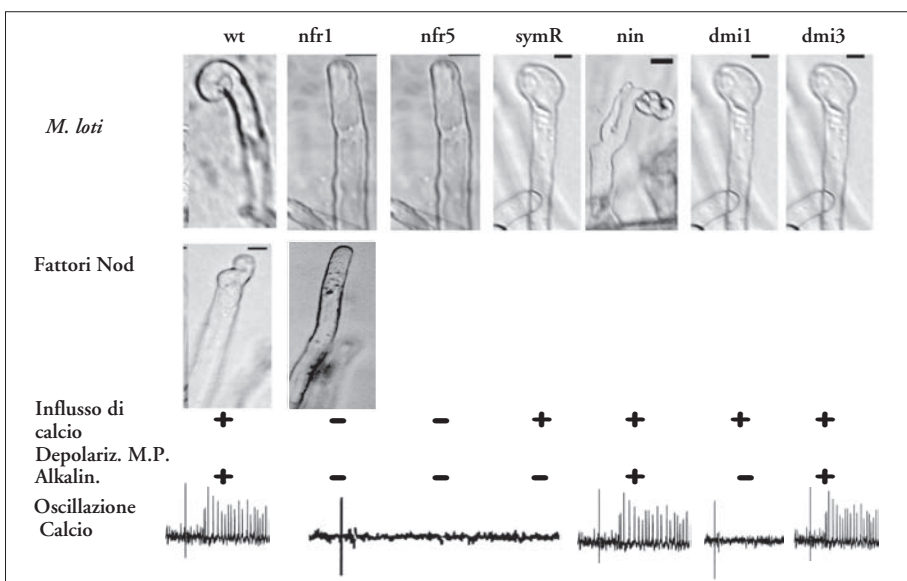


Fig. 1 Caratterizzazione fenotipica e fisiologica di mutanti delle leguminose modello *Lotus japonicus* e *Medicago Truncatula*. In alto; deformazione del pelo radicale indotta da infezione con *Mesorhizobium loti* o da applicazione di Fattori Nod. In basso; analisi dei flussi ionici nelle fasi molto precoci del processo simbiotico

La caratterizzazione a livello fenotipico dell'effetto inibitorio del segnale azoto sulla simbiosi azoto fissativa ha consentito di verificare che uno dei primi eventi a essere alterato in presenza dei fattori Nod è costituito dalla divisione delle cellule corticali della radice che divengono non suscettibili alla presenza di fattori Nod. L'analisi molecolare effettuata allo scopo di verificare se l'espressione dei geni codificanti per i fattori coinvolti nella cascata di eventi che porta alla formazione del nodulo radicale fosse alterata in presenza di varie fonti azotate ha evidenziato una forte inibizione nell'espressione del gene *NIN* che è normalmente fortemente indotto (circa 20 volte) a 24 ore dall'infezione batterica o dall'applicazione dei fattori Nod. Tale inibizione viene osservata quando la pianta viene cresciuta in presenza di concentrazioni 10mM di  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o  $\text{KNO}_3$  e non è ascrivibile a un effetto diretto di tali fonti azotate sull'attività biologica dei fattori Nod. È quindi ipotizzabile che il gene *NIN* giochi un ruolo cruciale nella segnalazione alla pianta delle condizioni azotate in cui essa si trova, e di conseguenza informa la pianta sulla necessità o meno di affrontare il dispendioso programma di interazione simbiotica con *Rhizobium*.

#### ABSTRACT

A typical example of a Nitrogen-Fixing Symbiosis (NFS) is represented by the interaction between Legume plants and bacteria of the family *Rhizobiaceae*. The result of this symbiotic interaction is a new plant organ developed as result of the bacteria infection on the root system of the legume plant, the nitrogen fixing root nodule. Inside the nodules, the bacteria found the optimal compartment for the fixation of the atmospheric nitrogen. In terms of metabolic exchange, the fixed N is exported in the form of ammonium to the plant cells of the nodules and in different amino acids forms to the rest of the plants, whereas the photosynthate products are transferred from the shoot to the nodule to supply the microbes partner with the amount of energy needed for the very expensive N fixation reaction. It was calculated that about 20% of the plant photosynthate is allocated to the nodule to allow the fixation of the atmospheric nitrogen. In legumes, development of nitrogen fixing nodules is induced by perception of lipochitin-oligosaccharide signals (Nod factors) secreted by the *Rhizobium* symbiont. Besides, nitrogen starvation is a prerequisite for formation, development and functioning of root nodules and high level of combined N in the form of nitrate and/or ammonium, through unknown signaling pathways can be perceived by legume plants and completely abolish nodule formation.

