

Giornata di studio su:
Messaggi molecolari nella rizosfera

Firenze, 23 febbraio 2006

LUCIANA GIOVANNETTI*

Dialoghi molecolari nella rizosfera: introduzione al tema

I progressi conseguiti nel mondo della biologia e soprattutto nel campo della microbiologia e in quello della neurobiologia della pianta suggeriscono che considerare il sistema di comunicazione dell'uomo come l'unico modo di comunicare inizia ad essere un concetto un po' stretto. È noto che tutte le forme di comportamento degli organismi coinvolgono processi di comunicazione basati su una serie complessa di codici dai quali dipende il successo o il fallimento della comunicazione stessa. Dialogare, comunicare sono azioni che non necessariamente debbono essere mediate da segnali e o simboli fonetici, ma sono azioni che si possono realizzare anche tramite molecole che assumono la funzione di segni. Un segnale in questo caso è spesso costituito da una molecola generata da un organismo che provoca una risposta in un altro che la recepisce.

La comunicazione molecolare ha aperto nuove prospettive di ricerca e ha assunto un fascino particolare con la scoperta che anche i batteri sono capaci di dialogare tra loro (Nelson et al., 1970) usando come segnali piccole molecole, gli autoinduttori, che una volta rilasciate nell'ambiente forniscono alle cellule informazioni preziose. Tale sistema di comunicazione, definito "quorum sensing" (Fuqua et al., 1994), indica una forma di dialogo tra batteri che ha come finalità il controllo dell'espressione genica in funzione della densità cellulare. Quando una popolazione batterica, naturalmente capace di sintetizzare autoinduttori, si accresce la concentrazione degli autoinduttori secreti aumenta e, una volta raggiunto un determinato livello (livello soglia), provoca una risposta nella popolazione batterica che porta a cambiamenti dell'espressione di specifici geni.

* *Dipartimento di Biotecnologie Agrarie-Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Firenze*

La possibilità di regolare l'espressione genica come risposta alla variazione di densità cellulare consente ai batteri di comportarsi diversamente quando la loro densità è bassa rispetto a quando è alta e porta quindi un organismo unicellulare a funzionare come un organismo pluricellulare. Le specie batteriche che controllano l'espressione genica a livello di comunità producendo e rispondendo a segnali chimici che si accumulano in un ambiente sono molte. Tuttavia generalmente ogni specie batterica produce e risponde a specifici segnali (Xavier e Bassler, 2003). I segnali molecolari più comunemente utilizzati dai batteri Gram-negativi sono, per quanto finora noto, molecole appartenenti alla categoria delle omoserina-lattoni (HSL), mentre quelli più usati

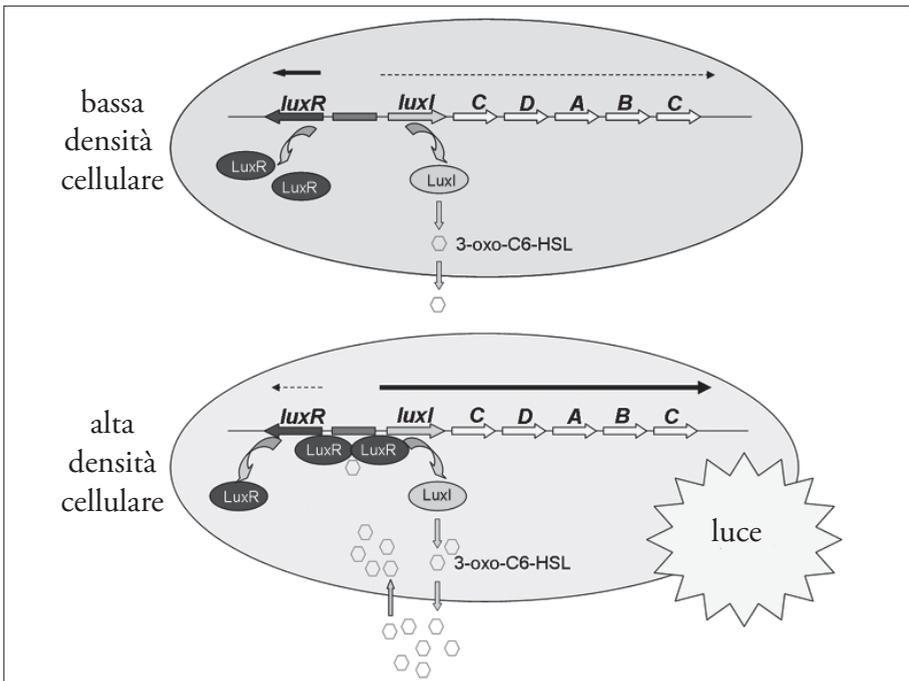


Fig. 1 "Quorum sensing" in *Vibrio fischeri*. A bassa densità cellulare, i geni *luxICDABE* (il gene *luxI* codifica per la sintesi dell'autoinduttore, la 3-oxo-C6-HSL, e i geni *luxCDABE* sono responsabili della bioluminescenza) sono trascritti ad un basso livello e le piccole quantità di 3-oxo-C6-HSL prodotte sono secrete nell'ambiente. Ad alta densità cellulare la 3-oxo-C6-HSL, una volta raggiunta la concentrazione soglia nell'ambiente, rientra all'interno della cellula. In questa fase all'interno della cellula si forma un complesso tra la proteina Lux R (codificata dal gene *luxR*), un fattore di trascrizione, e la 3-oxo-C6-HSL. Il complesso LuxR-3-oxo-C6-HSL, legandosi ad una regione del DNA che contiene promotori regolati dal "quorum sensing", aumenta la trascrizione dei geni *luxICDABE*. In questo modo il 3-oxo-C6-HSL autoinduce la propria sintesi e nello stesso tempo si amplifica il segnale "quorum sensing"

dai batteri Gram-positivi sono costituiti da oligopeptidi (Xavier, 2003; Dunn et al., 2002). Un esempio classico di “quorum sensing”, il primo descritto, è quello presente in *Vibrio fischeri* (fig. 1), un batterio marino luminescente simbiote di *Eurpimna scolopes* (calamaro).

Il sistema di comunicazione riportato in figura 1 avviene tra batteri appartenenti ad una stessa specie, ma la comunicazione tramite il “quorum sensing” può aver luogo anche tra specie batteriche diverse e sembra avere un ruolo fondamentale nello sviluppo di comunità microbiche complesse (Bassler, 1999; March e Bentley, 2004). In tali situazioni gli autoinduttori prodotti da determinati gruppi batterici sembrano essere responsabili della progressiva perdita di specie dominanti e della loro sostituzione con altre e quindi avere il compito di definire la struttura della comunità (Valle et al., 2004).

Un organismo nel corso della propria esistenza si trova ad instaurare processi di comunicazione molecolare con organismi appartenenti alla stessa specie (comunicazione intraspecie), a specie diverse (comunicazione interspecie) e anche con organismi appartenenti a regni diversi (comunicazione interorganismi).

La rizosfera, a causa della sua complessità e della sua tendenza ad andare incontro a cambiamenti anche repentini, è un ambiente dinamico nel quale la comunicazione, prevedendo dialoghi a livello intraspecie, interspecie e interorganismi, è complessa e richiede un’alta competenza comunicativa per agire interattivamente con successo su tutti e tre i livelli e distinguere molecole messaggere da rumori di sottofondo (fig. 2). Comunque nella rizosfera, sebbene vi siano vari tipi di comunicazione molecolare che si intersecano dando origine ad una fitta e complessa rete, semplificando e schematizzando, si possono individuare scambi tra radici-microrganismi PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, batteri che promuovono la crescita delle piante), radici-microrganismi simbiotici, radici-microrganismi fitopatogeni, radici-fauna, radici-radici, radici-suolo, microrganismi-microrganismi.

Le piante, tramite un elevato numero di molecole, emettono segnali che possono regolare la comunità microbica del suolo, stabilire rapporti di simbiosi, cambiare le proprietà chimico-fisiche del suolo, inibire la crescita di specie vegetali competitive. D’altra parte segnali molecolari prodotti dagli organismi coinvolti nelle relazioni che avvengono a livello delle radici influenzano l’attività, la crescita, lo stato di salute delle piante. Pertanto, spesso, il destino delle piante dipende dalla capacità delle radici di comunicare con gli altri organismi presenti nella rizosfera ed in modo particolare con i microrganismi, ma è anche vero che molti batteri e funghi dipendono dall’attività delle

piante. Tra le comunità della rizosfera quella batterica è costantemente colpita da una cacofonia di segnali che deve interpretare correttamente per assicurarsi la sopravvivenza. È davvero difficile immaginare come i batteri possano riconoscere i segnali veri da quelli falsi e sviluppare contemporaneamente complesse conversazioni molecolari con membri della propria specie come con membri di altre specie di microrganismi, di piante e di altri eucarioti. Jacob et al. (2004) affermano che il comportamento complesso dei batteri non possa essere spiegato se non ipotizzando che i batteri sviluppino una “memoria collettiva”, un’identità di gruppo, riconoscano altre popolazioni, “prendano decisioni” a livello di popolazione.

Il “quorum sensing” batterico, controllando la competenza, la coniugazione, la virulenza, l’adesione cellulare, il movimento, la sporulazione, la produzione di molecole correlate con le simbiosi, di metaboliti secondari, di enzimi

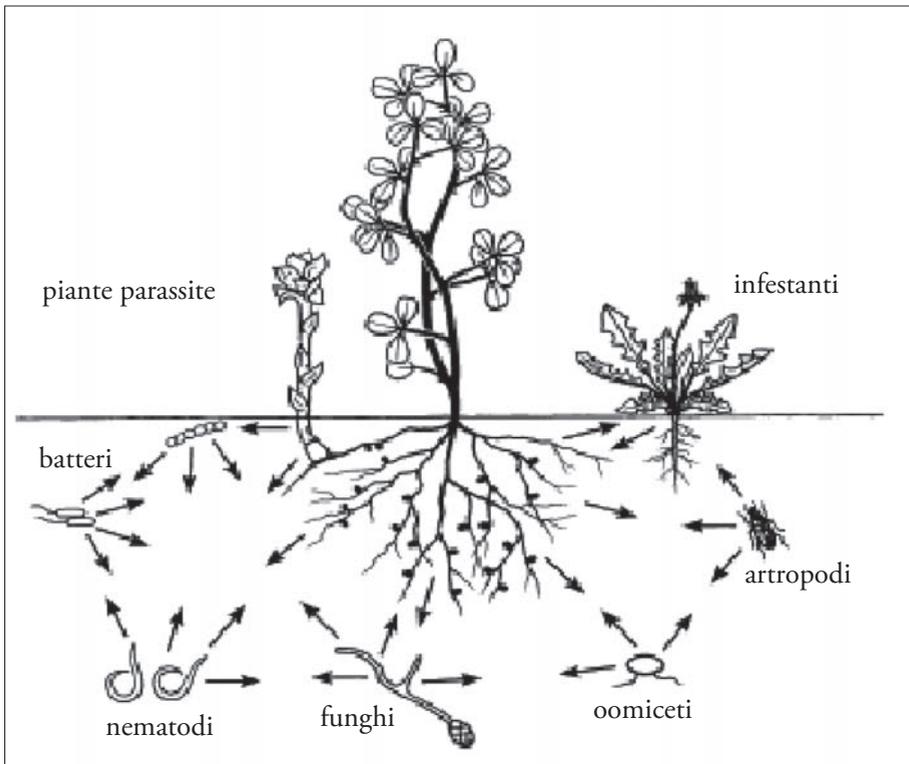


Fig. 2 Rappresentazione delle complesse relazioni che si verificano tra le radici della pianta e gli altri organismi del suolo. Le frecce indicano i segnali molecolari (Hirsch et al., 2003, modificato)

esocellulari, la formazione di biofilm, ha certamente un ruolo importante nella comunicazione pianta-batterio e nell'affermazione di una simbiosi o di uno specifico gruppo. Per esempio batteri fitopatogeni per esplicare la loro azione hanno elaborato strategie particolarmente sottili: i batteri, finché il loro numero rimane basso, si lanciano messaggi che inibiscono la produzione di sostanze dannose per la pianta, cosicché l'ospite non si rende conto della minaccia. Quando la popolazione batterica raggiunge una determinata densità cellulare "dà il via" all'attacco della pianta che, colta di sorpresa, non è in grado di mettere in atto le forme di difesa. D'altra parte alcune piante sono capaci di rispondere in maniera sofisticata ai segnali inviati dai batteri secernendo composti che, mimando gli autoinduttori, sono in grado di inibire o stimolare i segnali batterici e quindi confondere il sistema di regolazione "quorum sensing" del batterio (Bauer e Teplitski, 2001; Hirsch et al., 2003; Bauer e Mathesius, 2004). È stato inoltre osservato che specifici batteri possono interrompere i segnali "quorum sensing" di altri batteri, distruggendo gli autoinduttori (Bauer e Robinson, 2002; Bauer et al., 2005). Tale concetto, interruzione del sistema "quorum sensing" mediante la distruzione degli autoinduttori o tramite sostanze che li mimano, ha reso ancora più complesso il quadro della intensa rete di comunicazione tra piante e microrganismi ed ha aperto interessanti prospettive di ricerca che porteranno a comprendere meglio che cosa sono questi segnali, con quali recettori possono interagire, come i segnali regolano il destino degli organismi coinvolti nel dialogo, come si possono utilizzare i segnali ed i recettori per monitorare in campo le relazioni piante-altri organismi della rizosfera e per suggerire miglioramenti nella gestione di alcuni interventi agronomici e ambientali.

Sperando di essere riuscita a dare un'idea generale della complessità dei messaggi molecolari, alcuni dei quali saranno affrontati ed approfonditi nelle relazioni successive, che avvengono a livello del sistema radice-suolo, desidero concludere ricordando che la vita dell'uomo è strettamente associata ai 15-20 centimetri di suolo dello strato superficiale del nostro pianeta e che continuare a sfruttare in modo indiscriminato questa preziosa risorsa potrebbe provocare un forte impatto sulla rete dei dialoghi molecolari che nel suolo avvengono e sull'equilibrio che essi controllano e conseguentemente portare a cambiamenti nella dinamica degli organismi che vivono nel suolo. L'uomo con la sua elevata capacità di comunicare e di interagire con tutto quanto lo circonda dovrebbe tenere maggiormente presente che il suo destino è strettamente collegato, direttamente o indirettamente, con l'attività di numerosissime specie di microrganismi e di altri organismi che risiedono nel suolo e delle quali ancora troppo poco si conosce.

RIASSUNTO

Nella rizosfera, ambiente complesso e dinamico, virus, batteri, funghi, microfauna e piante instaurano una fitta rete di rapporti mediati essenzialmente da segnali molecolari. Numerose ricerche sono state condotte per studiare la natura di tali messaggi molecolari, le vie metaboliche che controllano la loro sintesi e l'impatto che essi esercitano sull'organismo bersaglio. Tuttavia i meccanismi che regolano le interazioni piante-microorganismi e le loro conseguenze sulla produttività e sullo stato di salute della pianta nonché sulla diversità della comunità microbica rizosferica sono ancora poco conosciuti. Una maggiore comprensione delle modalità attraverso le quali i segnali molecolari inviati dai microorganismi sono recepiti dalle piante e viceversa, oltre ad avere un interesse scientifico di base, potrà fornire preziosi suggerimenti per sviluppare nuove strategie che, tenendo conto dei meccanismi coinvolti nei rapporti piante-microorganismi, siano in grado di aumentare la produttività delle piante migliorandone la capacità di assorbire nutrienti e di resistere ai microorganismi fitopatogeni.

BIBLIOGRAFIA

- BASSLER B.L., (1999): *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*, «Current Opinion in Microbiology», 2, pp. 582-587.
- BAUER D.W., ROBINSON J. (2002): *Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms*, «Current Opinion in Biotechnology», 13, pp. 234-237.
- BAUER W.D., TEPLITSKI M. (2001): *Can plants manipulate bacterial "quorum sensing"?*, «Australian Journal of Plant Physiology», 28, pp. 913-921.
- BAUER W.D., MATHESIUS U. (2004): *Plant responses to bacterial quorum sensing signals*, «Current Opinion Plant Biology», 7, pp. 429-433.
- BAUER W.D., MATHESIUS U., TEPLITSKI M. (2005): *Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing*, «ASM News», 71, pp. 129-134.
- DUNN A.K., HANDELSMAN J. (2002): *Towards an understanding of microbial communities through analysis of communication networks*, «Antonie van Leeuwenhoek», 81, pp. 565-574.
- FUQUA W.C., WINANS S.C., GREENBERG E.P. (1994): *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*, «Journal of Bacteriology», 176, pp. 269-275.
- HIRSCH A.M., BAUER W.D., BIRD D.M., CULLIMORE J., TYLER B., YODER J.I. (2003): *Molecular signals and receptor: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms*, «Ecology», 84, pp. 858-868.
- JACOB E.B., AHARONOV Y., SHAPIRA Y. (2005): *Bacteria harnessing complexity*, «Biofilms», 1, pp. 239-263.
- MARCH C.J., BENTLEY W.E. (2004): *Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology*, «Current Opinion in Microbiology», 15, pp. 495-502.
- NEALSON K.P., PLATT T., HASTINGS J.W. (1970): *Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system*, «Journal of Bacteriology», 104, pp. 313-322.
- VALLE A., BAILEY M.J., WHITELEY A.S., MANEFIELD M. (2004): *N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge*, «Environmental Microbiology», 6, pp. 424-433.
- XAVIER K.B., BASSLER B.L. (2003): *LuxS quorum sensing: more than just a numbers of game*, «Current Opinion in Microbiology», 6, pp. 191-197.

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 *Rhizobiacee* 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.

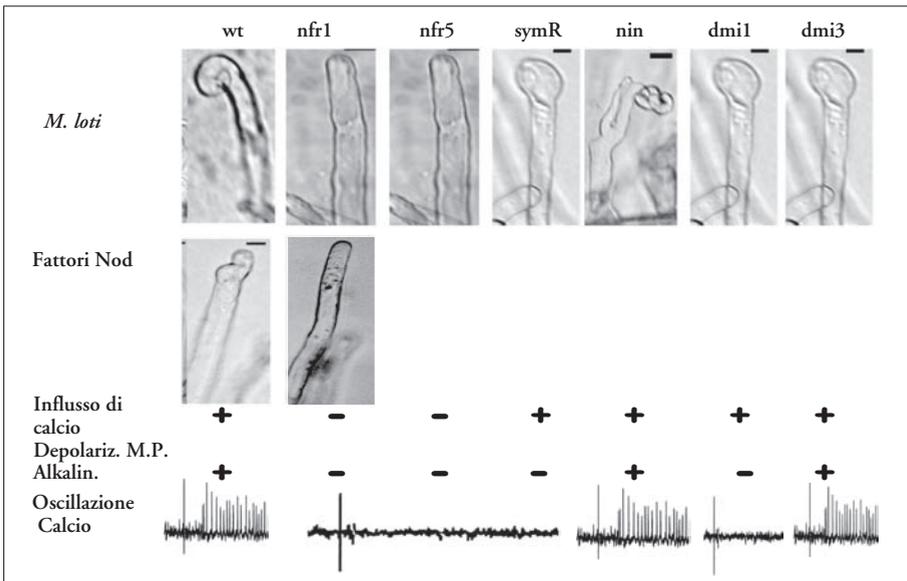


Fig. 1 Caratterizzazione fenotipica e fisiologica di mutanti delle leguminose modello *Lotus japonicus* e *Medicago Truncatula*. In alto; deformazione del pelo radicale indotta da infezione con *Mesorhizobium loti* o da applicazione di Fattori Nod. In basso; analisi dei flussi ionici nelle fasi molto 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 NH_4NO_3 o 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.

PAOLA BONFANTE*

Messaggi molecolari nella rizosfera: il dialogo tra piante, funghi simbiotici e batteri

Da quando Lorenz Hiltner un secolo fa propose il termine *rizosfera* per identificare il microambiente che si crea attorno alle radici delle piante e che coinvolge il substrato su cui le piante crescono, insieme con i micro-organismi con cui esse interagiscono, l'importanza di questa nicchia è cresciuta in modo esponenziale. Sono sempre più numerosi i libri, gli articoli, le rassegne, i progetti che studiano come la *rizosfera* sia il sito di importanti attività microbiche, come essa influenzi positivamente la crescita della pianta, la fertilità del suolo, le relazioni e la dinamica delle comunità microbiche del suolo (Pinton et al., 2003; de Boer et al., 2006). La rizosfera si forma in seguito al rilascio da parte delle radici di molecole organiche, che possono rappresentare più del 20% dei composti prodotti dalla pianta con il processo della fotosintesi (Grayston et al., 1997). Questi composti organici, rilasciati nel suolo attraverso il processo della rizodeposizione, prendono il nome di "essudati radicali" e la loro quantità e qualità determinano la composizione della flora microbica presente (Walker et al., 2003). Essi costituiscono infatti fonte di *nutrimento e di segnali* per i microrganismi associati alle radici (principalmente batteri e funghi), che aumentano in numero da 10 a 100 volte rispetto al suolo circostante.

Tra i microrganismi che si affollano intorno alle radici, alcuni hanno un effetto benefico sulla pianta: i *fitostimolatori* producono per esempio composti (fito-ormoni) che migliorano la salute delle piante e determinano un incremento nella produttività, mentre i *biofertilizzatori* migliorano la fertilità del terreno e danno un contributo rilevante alla nutrizione delle piante. Tra questi la comunità dei funghi micorrizici che si associano alle radici come simbiotici è molto importante.

* Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Torino – Istituto per la Protezione delle Piante – CNR

Lo scopo di questo articolo è di illustrare brevemente alcune delle caratteristiche biologiche dei funghi micorrizici e di evidenziare – sulla base dei risultati più recenti – come nella rizosfera piante, funghi, batteri, uniti da eventi simbiotici, si scambiano complessi segnali molecolari.

UNO SGUARDO ALLA BIOLOGIA DEI FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI:
DAL PROCESSO DI COLONIZZAZIONE AL GENOMA

I funghi micorrizici vengono considerati degli efficaci “biofertilizzatori” per le loro piante ospiti, in quanto ne influenzano la crescita, la nutrizione minerale, l’assorbimento dell’acqua e dei nutrienti, e le proteggono dalle malattie radicali. I funghi simbiotici, infatti, non solo svolgono un ruolo ecologico (van der Heijden e Sanders, 2002), ma sollevano anche interesse nello sviluppo di una agricoltura sostenibile, basata sulla limitazione dei fertilizzanti, sul rispetto degli equilibri microbiologici e sulla conservazione della struttura del suolo.

I funghi micorrizici appartengono a circa 6000 specie fungine, variamente distribuite tra Glomeromiceti, Ascomiceti e Basidiomiceti, e si associano con circa 240.000 specie, tra cui le più importanti piante di interesse agricolo e forestale (Bonfante e Perotto, 1995). Si realizzano così delle simbiosi che sono le più diffuse sulla terra e che – a seconda della posizione sistematica dei partners, delle loro interazioni cellulari, della capacità del fungo attraversare o no la parete cellulare della pianta ospite – si distinguono nei tipi principali delle ectomicorrize e delle endomicorrize (Bonfante e Perotto, 1995). Tra queste ultime, particolarmente significative sono le micorrize arbuscolari (AM). Grazie alla simbiosi micorrizica, basata sullo scambio di nutrienti, la pianta migliora il suo sviluppo vegetativo, mentre il fungo completa con successo il suo ciclo vitale.

Il grande numero di taxa vegetali e fungini coinvolti nella simbiosi micorrizica porta a una varietà di interazioni cellulari e di modelli anatomici. Tuttavia, alcuni caratteri sono costanti: ad esempio tutti i funghi simbiotici producono strutture extraradicali che, sotto forma di ife o propaguli, permettono ai funghi di sopravvivere nel suolo. In alcuni casi, le ife possono svilupparsi in coltura pura su mezzi agarizzati, dando vita a una fase vegetativa saprotrofica. Questa potenzialità è assai limitata nei funghi AM, che vivono solo in presenza della pianta ospite. I funghi AM, assegnati dal 2001 al nuovo phylum dei Glomeromycota (Schuessler et al., 2001), sono per molti aspetti organismi ancora misteriosi. Il legame così stretto con il mondo vegetale (si

tratta di biotrofi obbligati) costituisce il maggiore limite al loro studio, ma li rende anche molto interessanti da un punto di vista biologico e applicativo.

In seguito a segnali molecolari (paragrafo successivo), il micelio dei funghi AM – germinato dalle spore – si dirige verso le cellule radicali, prende contatto con i peli o con cellule epidermiche formando gli appressori, da cui originano le unità infettive. Nelle piante ospiti, i tessuti meristemati non sono coinvolti, come pure quelli vascolari; di conseguenza le caratteristiche strutture intracellulari (gomitoli e arbuscoli) si formano per lo più nelle cellule corticali. Alcuni isolati fungini – per iniziare l'unità infettiva – richiedono un preciso passaggio attraverso le cellule epidermiche (Bonfante et al., 2000). Le cellule dell'ospite rispondono invaginando la membrana plasmatica attorno al fungo e creando una zona di interfaccia, che ha molte somiglianze con lo spazio che si crea tra la membrana peribatteroide e il rizobio nei noduli radicali (Bonfante, 2001; Balestrini e Bonfante, 2005). Tuttavia, la riorganizzazione delle cellule vegetale all'entrata del fungo coinvolge anche altre componenti cellulari: il vacuolo si frammenta, gli amiloplasti scompaiono e il citoscheletro subisce profonde riorganizzazioni nelle sue componenti (Bonfante, 2001; Genre e Bonfante, 2005).

L'esplosivo aumento di conoscenze sulla biologia delle piante – avvenuto soprattutto grazie ai progetti di sequenziamento di *Arabidopsis thaliana* e di riso – si è accompagnato a un crescente interesse per la simbiosi AM, testimoniato dall'affermarsi di programmi internazionali. Tali progetti sono per lo più incentrati sulle piante ospiti (Parniske, 2004): in particolare, sono progetti di genomica e di genomica funzionale di organismi modello quali la leguminosa *Medicago truncatula* in grado di stabilire simbiosi radicali con i funghi AM e con i batteri azotofissatori (MEDICAGO, EU QL2-CT-2000-306076; Medicago project, <http://www.tigr.org>; Liu et al., 2003). Tuttavia, questi ricercatori hanno stimato che soltanto il 5% dei geni ottenuti da una biblioteca di cDNA di radici micorrizzate è di origine fungina. Il genoma fungino resta pertanto ancora inesplorato e molte domande sulla biologia dei funghi AM sono ancora senza risposta (Benedetto e Bonfante 2004). L'organizzazione del loro genoma, per esempio, risulta ancora un argomento ampiamente dibattuto. All'interno di singole spore, strutture di riproduzione multinucleate, è stata osservata un'ampia variabilità genetica (Gianinazzi-Pearson et al., 2004) la cui origine non è tuttora stata chiarita. Mentre alcuni gruppi considerano i funghi AM come organismi eterocariotici (Hijri e Sanders, 2005), altri li descrivono come poliploidi omocariotici (Pawlowska e Taylor, 2004). Questo e altri quesiti potranno forse trovare una soluzione con i dati di sequenza dell'intero genoma del fungo AM *Glomus intraradices*, che, contrariamente a

quanto accade per altri funghi AM, risulta possedere un genoma di dimensioni piuttosto piccole (Hijri e Sanders, 2005). È infatti in corso di svolgimento un progetto genoma finanziato dal DOE (USA) (<http://www.ornl.gov/sci/microbialgenomes/>). Tuttavia, una valida alternativa a tali strategie è rappresentata dai progetti EST. Tra gli approcci definiti di “genomica funzionale”, nel nostro laboratorio si è allestita una collezione EST da spore germinate del fungo *Gigaspora margarita*. Il 50% circa delle sequenze finora analizzate non presenta similarità significativa con proteine depositate nelle banche dati. Questo potrebbe suggerire l'esistenza di vere e proprie “novità” molecolari dei funghi AM oppure potrebbe riflettere il fatto che ci troviamo ancora nelle fasi iniziali di esplorazione dei genomi fungini. Le restanti sequenze, che presentano similarità significativa, sono state classificate in categorie funzionali: il 9% risultano proteine coinvolte nelle risposte di difesa suggerendo che la condizione di germinazione *in vitro* non sia una condizione di crescita ottimale per i funghi AM – dato non inatteso vista la loro condizione di simionti obbligati. La collezione EST è stata un ottimo punto di partenza per la successiva caratterizzazione di geni specifici. L'attenzione è stata rivolta in particolare a geni coinvolti nelle risposte di difesa per l'importanza che queste sequenze potrebbero avere nell'interazione con la pianta ospite e per il loro eventuale ruolo nel conferire una maggiore tolleranza a stress. È stata infatti dimostrata la capacità dei funghi AM di alleviare nelle piante ospiti gli effetti tossici di sostanze inquinanti, quali i metalli pesanti. I meccanismi molecolari alla base di questo effetto protezione restano tuttavia ancora sconosciuti. Un dato interessante in questo senso è stata la dimostrazione che il fungo AM *Gi. margarita* possiede molecole implicate nella chelazione di metalli pesanti quali le metallotioneine, MT (Lanfranco et al., 2002). Il gene *GmarMT1*, identificato all'interno della sopra citata collezione EST, codifica un polipeptide di basso peso molecolare che rappresenta una nuova classe di MT essendo costituito da due domini evolutivamente distinti: un N-terminale che mostra similarità con le MT di tipo I di piante e un C-terminale più simile a MT fungine. Più di recente è stato caratterizzato, sempre a partire da un clone EST, il gene per una superossidodismutasi Cu, Zn (*GmarCu, ZnSOD*) (Lanfranco et al., 2005). Le SOD sono enzimi responsabili della conversione dello ione superossido a H_2O_2 e ossigeno e rappresentano la prima linea di difesa contro gli stress ossidativi originati dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Un'analisi dettagliata del profilo di espressione indica che il gene *GmarCu, ZnSOD* è differenzialmente espresso durante le varie fasi del ciclo vitale, con il più alto livello di espressione nelle strutture fungine intraradicali. Queste strutture sono anche reattive alla DAB (diaminobenzidina)

che è stata utilizzata per localizzare l'accumulo di H_2O_2 . Nel loro complesso, i risultati suggeriscono che i sistemi di inattivazione delle ROS, quali la SOD, possano avere un ruolo importante nel dialogo pianta-fungo originando una compatibilità strutturale e funzionale tra i due partners.

Le tecniche di biologia molecolare si sono rivelate di straordinaria utilità per lo studio dei meccanismi messi in atto dalla pianta durante la simbiosi, ad esempio per spiegare le basi della migliorata nutrizione minerale, in particolare quella del fosforo. La caratterizzazione in un fungo AM di un trasportatore del fosfato attivo solo nelle ife esterne (Harrison e van Buuren, 1995) ha rappresentato la chiave di volta nella definizione dei funghi AM come biofertilizzatori. Ancora recentemente abbiamo dato conferma della capacità di alcuni ceppi di *Glomus mosseae* di agire come biofertilizzatori grazie alla presenza di specifici trasportatori del fosfato ad alta efficienza (Benedetto et al., 2005). I prodotti dei geni da noi identificati agiscono proprio nelle ife che si trovano nel suolo e fanno un'azione di 'ponte' tra il suolo e la pianta portando il fosforo dalla rizosfera all'interno della radice. Indagini condotte sulle piante ospiti dall'altra parte hanno messo in evidenza la presenza di trasportatori del fosfato che risultano espressi solo nelle cellule che contengono arbuscoli (Karandashov e Bucher, 2005).

I SEGNALI MOLECOLARI TRA PIANTA E FUNGO

Un altro ambito in cui la combinazione di approcci differenti (biologia molecolare, biologia cellulare, biochimica, chimica analitica) ha consentito straordinari avanzamenti è quello dei meccanismi che controllano lo scambio di segnali molecolari tra i partner e i primi eventi di riconoscimento e contatto.

È risaputo che funghi AM riconoscono e rispondono ai loro ospiti potenziali fin dai primi anni 90: da tempo Giovannetti et al. (1998) e Buée et al. (2000) hanno dimostrato che composti rilasciati dalle piante ospiti, ma non da quelle non ospiti, stimolano la ramificazione nelle ife che si sviluppano dalle spore. Queste modificazioni morfologiche aumentano la possibilità di contatto tra le ife e le radici ospiti e probabilmente segnalano uno switch a una attiva fase di crescita del fungo senza la quale non avviene la formazione dell'appressorio (Giovannetti et al., 1996). Solo recentemente la natura delle molecole attive presenti negli essudati radicali è stata identificata: Akyama et al. (2005) hanno identificato un sesquiterpene e precisamente uno strigalattone che è in grado di causare la ramificazione delle ife di germinazione. È interessante osservare che tali molecole sono rilasciate indipendentemente

dalla presenza del fungo e hanno svariate attività biologiche, tra cui quella di promuovere la germinazione dei semi di piante parassitiche. Tali molecole causano un aumento della attività respiratoria e una parallela induzione di alcuni geni mitocondriali (Tamasloukht et al., 2003). Ancora oscuro è il modo in cui i funghi AM segnalano la loro presenza alla pianta ospite. Kosuta et al. (2003) hanno osservato l'attivazione del gene ENOD11 in radici di *Medicago* sviluppatasi in presenza del fungo, ma separate da esso mediante una membrana. Questa attivazione è stata la prima dimostrazione dell'esistenza di una molecola segnale diffusibile di origine fungina, battezzata *myc factor*. Va sottolineato che l'induzione del gene interessa tipi cellulari diversi a seconda che il fungo contatti direttamente la radice oppure siano soltanto presenti gli elicitor fungini. Nel primo caso l'espressione di ENOD11 è confinata alle cellule contattate dal fungo mentre, in presenza degli elicitor, essa viene rivelata in un più ampio numero di cellule dell'epidermide e del parenchima corticale. Questo sembrerebbe indicare la presenza di un meccanismo di feedback negativo, che bloccherebbe l'espressione di ENOD11 nelle cellule che non vengono contattate né colonizzate dal fungo (Chabaud et al., 2002).

Il quadro delle prime fasi di interazione in una simbiosi AM pertanto prevede che molecole segnale prodotte dalla pianta siano in grado di indurre la produzione di molecole segnale fungine e/o viceversa e che queste molecole siano quindi responsabili dell'attivazione di risposte specifiche nel rispettivo partner.

Se l'identità delle molecole direttamente coinvolte nel signalling è ancora parzialmente da definire (almeno per quel che riguarda l'ipotetico *myc factor*), nuove informazioni sono venute dall'uso di piante GFP (Green Fluorescent Protein): tali piante hanno permesso di registrare *in vivo* le modificazioni della cellula epidermica quando il fungo AM è ancora sulla superficie della radice (nella micorrizosfera). Genre et al. (2005) hanno osservato che è sufficiente la formazione dell'appressorio per scatenare straordinari cambiamenti nella cellula epidermica: il nucleo si muove verso il punto di contatto fungo/cellula epidermica, si riorganizzano il citoscheletro e il reticolo endoplasmatico, e si forma un nuovo apparato, definito Pre-penetration Apparatus (PPA). Esso viene guidato dal nucleo e spinto ad attraversare tutta la cellula epidermica e a formare una sorta di tunnel cavo. Solo quando il PPA si è formato, il fungo entra all'interno della cellula, inizia la fase di colonizzazione intraradicale e il PPA si dissolve. Questi esperimenti dimostrano che la pianta "sente" il fungo prima del suo arrivo e mette in atto un processo di "ospitalità". Sarà cruciale capire quale tipo di segnale (fisico, localizzato, diffusibile) venga rilasciato dal fungo (o forse dalla pianta) per scatenare tale reazione.

I recenti successi nello studio del signaling tra pianta e fungo simbiote sono stati molto facilitati dall'uso di piante mutanti, come strumenti per una dissezione genetico-molecolare. I primi mutanti identificati erano piselli difettivi nelle loro capacità di formare noduli con i rizobi (Duc et al., 1989), e incapaci di stabilire una simbiosi funzionale con un fungo simbiote. Essi misero in rilievo una sovrapposizione nei programmi genetici che controllano le due simbiosi (Kistner e Parniske, 2002). Questi studi aprirono la possibilità da una parte di identificare i geni che sono direttamente responsabili dello stabilirsi della simbiosi (Parniske 2004; Imaizumi-Anraku et al., 2005), dall'altra di offrire strumenti geneticamente caratterizzati per affrontare il problema della segnalazione tra fungo e pianta.

ENDOBATTERI VIVONO DENTRO I FUNGHI AM

Oltre che per l'importanza ecologica e applicativa, i funghi micorrizici arbuscolari rappresentano un sistema di grande interesse biologico anche per studiare l'interazione cellulare e molecolare tra un eucariote e un procariote (Bianciotto et al., 2002). I funghi AM sono infatti organismi unici in questo senso poiché rappresentano una nicchia specializzata per alcuni batteri bastoncellari non coltivabili. In almeno un caso (l'isolato fungino AM *Gigaspora margarita* BEG 34), tali endobatteri sono stati assegnati a un nuovo taxon sulla base delle sequenze ribosomali: *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (Bianciotto et al., 2003). All'interno delle spore della specie AM *Gi. margarita* sono infatti presenti endobatteri (circa 20000 batteri/spora) identificati come appartenenti al gruppo dei Proteobatteri e al genere *Burkholderia* sulla base delle sequenze del gene ribosomale (Bianciotto et al., 1996). Esperimenti di PCR usando degli oligonucleotidi specifici (BLOf-BLOr) hanno dimostrato che la stessa popolazione batterica è presente in tutte le fasi del ciclo vitale del fungo: spora, micelio extraradicale, ife del fungo durante la fase simbiotica all'interno delle radici della pianta ospite.

Le endosimbiosi pongono affascinanti quesiti su come gli endosimbionti vengano acquisiti, sulle loro storie evolutive, sulle loro modalità di trasmissione (Margulis e Chapman, 1998). Alcuni sistemi batteri/insetti, batteri/molluschi sono stati oggetto di dettagliate analisi genetico-molecolari, che hanno permesso di evidenziare sia eventi di coevoluzione tra ospiti procarioti e "contenitori" eucarioti, sia di mostrare come parecchi batteri passano da una generazione all'altra tramite meccanismi di trasmissione verticale. Il fatto che endobatteri siano presenti, anche se non identificati, in molti Glomerycota,

e non solo nella ristretta famiglia delle Gigasporacee (Scannerini e Bonfante, 1991), suggerisce che questa associazione sia comparsa molto presto nella storia evolutiva degli organismi viventi. Inoltre il fatto che spore di *G. margarita*, mantenute in coltura su piante ospiti come il trifoglio, in condizioni molto controllate, in cella climatica e su terreno sterile, mantengano i batteri da più di dieci anni (Bianciotto, osservazione personale) suggerisce la presenza di un qualche ben definito e non casuale meccanismo di trasmissione.

Lo stato di biotrofismo obbligato sia dei funghi AM che dell'endobatterio *Candidatus G. gigasporarum* ci ha spinto a mettere a punto in collaborazione con l'équipe de Mycologie Végétale dell'Università Paul Sabatier (Francia), un sistema particolare per poter studiare in modo più approfondito le modalità di trasmissione di questi endobatteri, in particolare in *Gi. margarita* BEG34. Tale modello, basato su radici trasformate di carota che sono state colonizzate da singole spore di *Gi. margarita*, ci ha permesso di dimostrare, in un sistema axenico privo di rischi di contaminazione orizzontale, che gli endobatteri sono trasmessi verticalmente. L'utilizzo di primers specifici, disegnati sui geni ribosomali 16S e 23S di *Candidatus G. gigasporarum* e il sequenziamento diretto ci hanno consentito, inoltre, di seguire la trasmissione degli endobatteri da una generazione all'altra di spore e di verificare l'identità e l'omogeneità della popolazione batterica di *Candidatus G. gigasporarum* (Bianciotto et al., 2004). Recentemente è stato inoltre dimostrato che tale endobatterio ha il più piccolo genoma conosciuto tra i β proteobatteri (Jargeat et al., 2004). Solo maggiori informazioni sul genoma di *Candidatus G. gigasporarum* ci potranno aiutare nel decifrare il dialogo del batterio con il suo ospite fungino e/o con la pianta ospite. Raggiungere tale obiettivo non sarà certo facile, a causa della natura di biotrofi obbligati di ambedue i microrganismi: lo sviluppo di moderne piattaforme tecnologiche dovrebbe tuttavia rendere tale prospettiva raggiungibile.

CONCLUSIONI

In conclusione, le analisi sul sistema piante/funghi simbiotici/batteri dimostrano che tali interazioni sono estremamente complesse e che difficoltà metodologiche – causate dallo stile di vita dei funghi appartenenti ai Glomeromycota e dei loro endobatteri – hanno impedito finora approcci su larga scala tali da fare luce piena sul loro comportamento e sulla loro dipendenza dalle piante ospiti. Tuttavia, analisi cellulari, biochimiche e molecolari hanno recentemente permesso di decifrare alcune battute del dialogo molecolare che

essi si scambiano. Non è forse lontano il tempo in cui una qualche stele di Rosetta ci permetterà di leggere i segnali molecolari rizosferici.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutto il gruppo di ricerca che nel Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università di Torino e nell'IPP-CNR di Torino collabora da anni a sviluppare alcune delle tematiche qui riassunte. I progetti sono stati finanziati da CNR-IPP, Commessa Biodiversità, Cebiovem, Progetto Prin 2003, Fondi Ateneo e Fondi del progetto europeo Genomyca e Integral.

ABSTRACT

The rhizosphere is a biologically active area where microbes develop, interact with each other, and compete for space, nutrients and root exudates. Mycorrhizal fungi, and in particular those forming arbuscular mycorrhizas (AMs) are a significant rhizosphere component.

This short review is focused on the events which occur in the rhizosphere and at the root surface, the rhizoplane. The signals which allow the establishment of AM symbiosis are still largely unknown; however, root exudates as chemotropic molecules and fungal soluble molecules, are expected to play an active role in the pre-symbiosis steps. Colonization success is the further requisite for nutrient exchanges. Early events are located in the rhizoplane, involving epidermal cells and extraradical hyphae. In order to identify genetically defined steps in the development of the symbiotic interaction, plant mutants impaired in AM symbiosis were used. The results show relevant changes in the cell responses of epidermis, in the cytoskeleton organisation and in the expression of fungal genes related to the oxidative burst. Once the symbiosis is established, the symbiotic contribution of AM fungi derives principally from the active network of soil hyphae extending from the root surface into the rhizosphere. Molecular techniques recently offered insights on the mechanisms developed by AM fungi for improving access to limiting soil resources.

Taken in their whole the results show that the main checkpoints, which trigger the symbiosis with the release of bioactive molecules, control the success of plant-AM fungi interactions and lastly improve plant nutrition, are located in the rhizosphere-rhizoplane *continuum*.

BIBLIOGRAFIA

- AKIYAMA K., MATSUZAKI K., HAYASHI H. (2005): *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi*, «Nature», 435, pp. 824-827.
- BALESTRINI R., BONFANTE P. (2005): *The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall?*, «Plant Biosystems», 139, pp. 8-15.

- BENEDETTO A., BONFANTE P. (2004): *Snapshots of AM fungi: still an endless tale...*, «Mycol. Res.», 108, pp. 337-340.
- BENEDETTO A., MAGURNO F., BONFANTE P., LANFRANCO L. (2005): *Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae*, «Mycorrhiza», 15, pp. 620-627.
- BIANCIOOTTO V., BANDI C., MINERDI D., SIRONI M., TICHY H.V., BONFANTE P. (1996): *An obligately endosymbiotic fungus itself harbors obligately intracellular bacteria*, «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 3005-3010.
- BIANCIOOTTO V., PEROTTO S., RUIZ-LOZANO J., BONFANTE P. (2002): *Arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria: from cellular investigations to biotechnological perspectives*, in Gianinazzi S., Schüepp H., Barea J.M., Haselwandter K. (eds), *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, Birkhäuser Verlag, Switzerland.
- BIANCIOOTTO V., LUMINI E., BONFANTE P., VANDAMME P. (2003): *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* gen. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi, «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology», 53, pp. 121-124.
- BIANCIOOTTO V., GENRE A., JARGEAT P., LUMINI E., BÉCARD G., BONFANTE P. (2004): *Vertical transmission of Endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita through generation of vegetative spores*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, pp. 3600-3608.
- BONFANTE P. (2001): *At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton*, in B. Hock (ed), *Mycota*, IX: *Fungal Associations*, Springer Verlag, Berlin, pp. 45-91.
- BONFANTE P., PEROTTO S. (1995): *Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants*, «New Phytol.», 130, pp. 3-21.
- BONFANTE P., GENRE A., FACCIO A., MARTINI I., SCHAUSER L., STOUGAARD J., WEBB J., PARNISKE M. (2000): *The Lotus japonicus LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 1109-1120.
- BUÉE M., ROSSIGNOL M., JAUNEAU A. (2000): *The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 693-698.
- CHABAUD M., VENARD C., DEFAUX-PETRAS A., BÉCARD G., BARKER D.G. (2002): *Targeted inoculation of Medicago truncatula in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi*, «New Phytologist», 156, pp. 265-273.
- DE BOER W., KOWALCHUK G.A., VAN VEEN J.A. (2006): *'Root-food' and the rhizosphere microbial community composition*, «New Phytology», 170, pp. 3-6.
- DUC G., TROUVELOT A., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S. (1989): *First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc-) obtained in pea (Pisum sativum L.) and fababean (Vicia faba L.)*, «Plant Science», 60, pp. 215-222.
- GENRE A., CHABAUD M., TIMMERS T. (2005): *Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection*, «Plant Cell.», 17, pp. 3489-3499.
- GENRE A., BONFANTE P. (2005): *Building a mycorrhizal cell: How to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi*, «Journal of Plant Interactions», 1, pp. 3-13.
- GIANINAZZI-PEARSON V., AZCON C., BÉCARD G., BONFANTE P., FERROL N., FRANKEN P., GOLLOTTE A., HARRIER L.A., LANFRANCO L., VAN TUINEN D. (2004): *Structural and*

- functional genomics of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi*, in Tkacz J.S., Lange L. (eds), *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*, Kluwer Academic-Plenum Publisher.
- GIOVANNETTI M., SBRANA C. (1998): *Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi*, «Mycorrhiza», 8, pp. 123-130.
- GIOVANNETTI M., SBRANA C., CITERNESI A.S. (1996): *Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi*, «New Phytologist», 133, pp. 65-71.
- GRAYSTON S.J., VAUGHAN D., JONES D. (1997): *Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability*, «Applied Soil Ecology», 5, pp. 29-56.
- HARRISON M.J., VANBUUREN M.L. (1995): *A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus Glomus versiforme*, «Nature», 378, pp. 626-629.
- HIJRI M., SANDERS I.R. (2005): *Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei*, «Nature», 433, pp. 160-163.
- IMAIZUMI-ANRAKU H., TAKEDA N., CHARPENTIER M., PERRY J., MIWA Y., KOUCHI H., MURAKAMI Y., MULDER L., VICKERS K., PIKE J., DOWNIE J.A., WANG T., SATO S., ASAMIZU E., TABATA S., YOSHIKAWA M., MUROOKA Y., WU G.J., KAWAGUCHI M., KAWASAKI S., PARNISKE M., HAYASHI M. (2005): *Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots*, «Nature», 433, pp. 527-531.
- JARGEAT P., COSSEAU C., OLA'H B. (2004): *Isolation, free-living capacities, and genome structure of "Candidatus glomeribacter gigasporarum", the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus Gigaspora margarita*, «Journal of Bacteriology», 186, pp. 6876-6884.
- KARANDASHOV V., BUCHER M. (2005): *Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas*, «Trends in Plant Science», 10, pp. 22-29.
- KISTNER C., PARNISKE M. (2002): *Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis*, «Trends Plant Science», 7, pp. 511-518.
- KOSUTA S., CHABAUD M., LOUGNON G., GOUGH C., DÉNARIE J., BARKER D.G., BÉCARD G. (2003): *A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of Medicago truncatula*, «Plant Physiology», 131, pp. 1-11.
- LANFRANCO L., BOLCHI A., CESALE ROS E., OTTONELLO S., BONFANTE P. (2002): *Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus*, «Plant Physiology», 130, pp. 58-67.
- LANFRANCO L., NOVERO M., BONFANTE P. (2005): *The mycorrhizal fungus Gigaspora margarita possesses a CuZn superoxide dismutase which is up-regulated during symbiosis with legume hosts*, «Plant Physiology», 137, pp. 1319-1330.
- LIU J., BLAYLOCK L., ENDRE G., CHO J., TOWN C.D., VANDENBOSCH K., HARRISON M.J. (2003): *Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Plant Cell», 15, pp. 2106-2123.
- MARGULIS L., CHAPMAN M.J. (1998): *Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution*, «Trends in Microbiology», 6, pp. 342-345.
- PARNISKE M. (2004): *Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Current Opinion in Plant Biology», 7, pp. 414-421.
- PAWLOWSKA T.E., TAYLOR J.W. (2004): *Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi*, «Nature», 427, pp. 733-737.

- PINTON R., VARANINI Z., NANNIPIERI P. (2003): *The rizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil plant interface*, Marcel Dekker, New York.
- SCANNERINI S., BONFANTE P. (1991): *Bacteria and Bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi*, in *Symbiosis as a source of evolutionary innovation*, Margulis L., Fester R. (eds), The MIT Press, Cambridge Massachusetts, pp. 273-287.
- SCHUESSLER A., SCHWARZOTT D., WALKER C. (2001): *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*, «Mycology Research», 105, pp. 1413-1421.
- TAMASLOUKHT M., SEJALON-DELMAS N., KLUEVER A. (2003): *Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora rosea*, «Plant Physiology», 131, pp. 1468-1478.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., SANDERS I.R. (2002): *Mycorrhizal ecology: Synthesis and perspectives*, in *Mycorrhizal Ecology*, Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R. (eds), «Studies in Ecology», 157, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 441-456.
- WALKER T.S., BAI H.P., GROTEWOLD E., VIVANCO J.M. (2003): *Root Exudation and Rhizosphere Biology*, «Plant Physiology», 132, pp. 44-51.

Segnali molecolari nella rizosfera: ruolo dei nutrienti e delle molecole umiche

INTRODUZIONE

La sopravvivenza e la produttività delle piante coltivate sono strettamente dipendenti dalla capacità di adattamento all'ambiente; a livello ipogeo questo processo è il risultato dell'interazione fra le radici e le componenti biotiche e abiotiche del suolo e riguarda quella zona presente nelle immediate vicinanze della radice che prende nome di rizosfera (Pinton et al., 2001). La composizione chimica della rizosfera e, in particolare la disponibilità di nutrienti, può influenzare lo sviluppo e la fisiologia della radice; la pianta infatti integra le informazioni ricevute dall'esterno con i fabbisogni interni e modula di conseguenza l'acquisizione dei nutrienti, la crescita, i cicli metabolici e l'allocazione delle riserve.

La distribuzione dei nutrienti nel suolo non è uniforme, e molto variabile è la loro concentrazione in soluzione. Variazioni nella composizione ionica della rizosfera si verificano come conseguenza dell'attività della radici: l'assorbimento e rilascio di specie organiche e inorganiche da questi tessuti, combinato ai movimenti degli ioni dalle fasi solida e liquida del suolo, determinano nella rizosfera la formazione di gradienti radiali e longitudinali che variano in funzione del tipo di elemento nutritivo (Hinsinger, 2004).

Per far fronte alla scarsa o ineguale distribuzione dei nutrienti alla rizosfera le piante hanno sviluppato meccanismi che coinvolgono modificazioni dell'architettura e morfologia della radice e della sua funzionalità, come dimostrato dalla capacità di modulare l'operatività dei meccanismi di trasporto ionico

* *Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine*

transmembrana e di rilasciare nella rizosfera molecole organiche (rizodeposizioni) in grado di modificarne le caratteristiche chimico-fisiche (Marschner, 1995). La rapidità e specificità della risposta alle fluttuazioni di determinati nutrienti (ad es. nitrato, solfato) o alla scarsità di altri (ad es. fosfato, ferro) suggeriscono da una parte un ruolo di tali elementi quali segnali molecolari capaci di indurre modificazioni morfo-fisiologiche nelle radici, dall'altro la capacità delle radici di percepire la variabile disponibilità dei nutrienti alla rizosfera. Questo quadro è ulteriormente complicato dalla contemporanea presenza nel suolo rizosferico di nutrienti diversi e di componenti organiche naturali, quali le molecole umiche, in grado di interferire con i meccanismi preposti all'acquisizione dei nutrienti e quelli coinvolti nello sviluppo della radice.

La comprensione dei fenomeni che governano le modificazioni nella composizione ionica è di fondamentale importanza per una corretta gestione del sistema suolo-pianta nell'ottica di pervenire a un'ottimizzazione dell'efficienza di cattura dei nutrienti da parte delle piante in coltura.

La membrana plasmatica delle cellule radicali costituisce la principale barriera fra l'ambiente rizosferico e il citosol. Lavorando a stretto contatto con il citoplasma e l'apoplasto, questo organello gioca un ruolo centrale nelle complesse interazioni che si verificano fra radici e soluzione del suolo: contribuisce infatti al trasporto dei nutrienti nelle cellule radicali e media l'estrusione e il rilascio di composti quali protoni, elettroni, acidi organici che causano la modificazione delle caratteristiche chimiche della rizosfera (Varanini, 2004). In questo contesto, i meccanismi biochimici che regolano le interazioni fra radice e suolo, devono essere sensibili e reattivi sia alle condizioni metaboliche imposte dall'interno sia alle condizioni che si verificano nell'ambiente rizosferico; ciò implica non solo l'esigenza di possedere sensori delle condizioni esterne ma anche la possibilità di una efficiente regolazione delle attività enzimatiche e di trasporto.

Tra le diverse classi di proteine presenti nel plasmalemma, quelle che rivestono particolare importanza in questo senso sono la PM H^+ -ATPasi (enzima responsabile della creazione del gradiente elettrochimico di protoni necessario per attivare la gran parte del trasporto di ioni e metaboliti) e i trasportatori ionici. Queste strutture possono ragionevolmente costituire i bersagli dei diversi segnali presenti alla rizosfera. Di seguito saranno discussi alcuni casi che confermano questa idea e saranno presentate evidenze a sostegno del potenziale ruolo di molecole inorganiche e organiche presenti nella rizosfera come segnali capaci di modulare la nutrizione e lo sviluppo dell'apparato radicale e, di conseguenza, dell'intera pianta.

IL CASO DEL NITRATO

L'azoto è l'elemento nutritivo richiesto e assorbito in maggiore quantità dalle piante per il suo ruolo essenziale di componente di biomolecole di primaria importanza come proteine, acidi nucleici e coenzimi. Nei terreni agricoli ben aereati delle zone temperate la forma nitrica è in netta prevalenza rispetto alla forma ammoniacale. Il nitrato non interagisce con la fase solida del terreno, per cui risulta particolarmente lisciviabile, caratteristica che ne riduce l'efficienza d'uso da parte delle piante. D'altro canto le piante hanno evoluto sistemi per la cattura di questa forma del nutriente.

Lo studio delle variazioni della velocità di assorbimento del nitrato in piante esposte al nutriente ha messo in evidenza come a una fase di rapido incremento della velocità di assorbimento (induzione) segua una diminuzione determinata dall'accumulo dello stesso nitrato e, in particolar modo, di glutammina (primo prodotto dell'assimilazione riduttiva dell'anione). Con approccio molecolare e l'uso di mutanti è stato possibile accertare che le piante acquisiscono l'anione dal terreno attraverso l'attività combinata di sistemi ad alta e bassa affinità, codificati da geni diversi (Forde, 2000). Alcuni di questi trasportatori sono espressi costitutivamente mentre altri sono nitrato-inducibili e soggetti a regolazione negativa a feedback da prodotti dell'assimilazione del nitrato (Glass, 2002); durante l'induzione della maggior capacità di assorbimento dell'anione, è stato inoltre dimostrato che esiste uno stretto legame fra le variazioni di espressione di un trasportatore ad alta affinità e isoforme specifiche della PM H^+ -ATPasi (Santi et al., 2003).

Questi risultati avvalorano l'idea che il nitrato possa svolgere un ruolo da segnale capace di evocare un aumento della trascrizione dei geni che codificano per le proteine coinvolte nel suo assorbimento e successiva assimilazione (Stitt, 1999).

L'apparato radicale è una struttura altamente plastica capace di adattarsi alle variabili condizioni edafiche del suolo (Hodge, 2004); l'architettura e la morfologia radicale sono determinate da geni la cui espressione può essere modulata in risposta a variazioni della disponibilità dei nutrienti (Lopez-Bucio et al., 2003); nella pianta modello *Arabidopsis* è stato individuato un gene (*ANRI*) che codifica per un fattore di trascrizione implicato nella regolazione della crescita delle radici laterali in risposta a cambiamenti nel rifornimento di nitrato esterno (Zhang e Forde, 1999); l'approfondimento di questi studi ha messo in evidenza un controllo di tipo locale (stimolatorio) e uno di tipo sistemico legato allo stato nutrizionale della pianta (inibitorio) da parte dell'anione (Gan et al., 2005).

La maggior parte degli studi volti a chiarire gli aspetti fisiologici e molecolari dell'assorbimento del nitrato sono stati condotti considerando l'intero apparato radicale, mentre è stato osservato che l'assorbimento del nitrato varia non solo tra le differenti tipologie radicali, ma anche lungo gli assi radicali (Colmer e Bloom, 1998); ai fini della comprensione dei fenomeni che avvengono alla rizosfera risulta importante verificare come le cinetiche di trasporto del nitrato e la regolazione del suo assorbimento varino nei diversi tipi di radice e lungo l'asse radicale. Risultati recenti (Monte et al., 2005) hanno evidenziato come, in plantule di mais, cereale che richiede elevati livelli di azoto disponibile, le radici seminali presentino un livello di induzione dell'assorbimento dell'anione pressoché costante lungo l'asse radicale, mentre nelle radici primarie la risposta appare più variabile; è stato inoltre dimostrato che le variazioni della velocità di assorbimento dell'anione che si riscontrano lungo l'asse radicale sono accompagnate da analoghe variazioni dell'attività e quantità della pompa protonica del plasmalemma radicale, confermando uno stretto legame fra l'enzima e i meccanismi di assorbimento dell'anione.

È noto che in molte specie vegetali il rapporto azoto/zolfo è piuttosto costante, evidentemente come riflesso della presenza di amminoacidi solforati nelle proteine. In particolare è stato osservato che i pathways assimilativi di azoto e zolfo sono simili e coordinati e che la carenza di un elemento reprime l'assimilazione dell'altro (Koprivova et al., 2000). Studi recenti (Giorgio, 2006) dimostrano che la deprivazione di zolfo limita l'induzione della maggior velocità di assorbimento del nitrato determinata dal contatto delle radici con la soluzione contenente l'anione; queste condizioni determinano anche una minore espressione dei geni coinvolti nell'assorbimento dell'anione (trasportatori ad alta affinità e isoforme della PM H^+ -ATPasi), in una fase in cui non è ancora evidente un incremento della velocità di assorbimento del solfato. Queste osservazioni confermano che aggiustamenti nell'assorbimento dei due ossianioni (nitrato e solfato) possono avvenire in tempi rapidi ed essere influenzati dai reciproci rapporti tra i nutrienti presenti alla rizosfera.

IL CASO DEL FERRO

Nonostante il ferro sia uno degli elementi più rappresentati nel suolo (0,5-5%), la sua disponibilità per le piante è fortemente limitata dalla scarsa solubilità degli ossidi e idrossidi di ferro ai livelli di pH del suolo compatibili con la crescita delle piante. D'altro canto, i vegetali rispondono alla limitata biodisponibilità di ferro con l'attivazione di meccanismi che variano in funzione della specie

(Marschner e Römheld, 1994). Le piante dicotiledoni e le monocotiledoni non graminacee (Strategia I) solubilizzano e acquisiscono il ferro attraverso un insieme di meccanismi che comprendono l'acidificazione della rizosfera, la complessazione con molecole organiche rilasciate dalle radici e la riduzione del Fe(III) complessato a Fe(II) per il successivo assorbimento attraverso l'azione di un trasportatore specifico per lo ione bivalente. Le risposte delle radici sono spesso localizzate nelle zone sub-apicali e associate a cambiamenti morfologici della zona periferica della radice, quali la sovrapproduzione di peli radicali e la formazione di "transfer cells" (Müller e Schmidt, 2004). L'insieme di queste funzioni è controllato dallo stato nutrizionale della pianta; in particolare l'espressione dei geni che codificano per la Fe(III)-chelato riduttasi (*FRO2*) e per il trasportatore del Fe^{2+} (*IRT1*) a livello del plasmalemma radicale in *Arabidopsis* è indotta in condizioni di limitata disponibilità di ferro e rapidamente de-indotta a seguito della somministrazione del micronutriente alle piante carenti (Curie e Briat, 2003). I geni *IRT1* e *FRO2* appaiono co-regolati sia a livello trascrizionale che post-traduzionale (Connolly et al., 2002, 2003); questo doppio livello di regolazione può rappresentare un meccanismo non solo per garantire un'efficiente acquisizione del ferro, ma anche per prevenire eccessivi accumuli del nutriente durante la risposta adattativa. Esperimenti "split-root", che prevedono il rifornimento di ferro solo a una parte dell'apparato radicale, hanno permesso di dimostrare che l'espressione di *IRT1* e *FRO2* è controllata da un segnale sistemico proveniente dalla parte aerea (Vert et al., 2003). D'altra parte, modulando la concentrazione di ferro apoplastico è stato possibile dimostrare che il ferro *per se* svolge un ruolo importante nella regolazione della risposta alla Fe-carezza a livello trascrizionale. L'insieme di questi dati indica che la produzione delle proteine deputate all'acquisizione del ferro nelle radici è regolata dall'integrazione dei due tipi di segnale, locale e sistemico. L'acidificazione della rizosfera è stata attribuita all'attivazione della PM H^+ -ATPasi radicale (Dell'Orto et al., 2000); questa conclusione è avvalorata dall'osservazione di un accumulo della proteina nelle zone di intensa acidificazione e in particolare a livello delle "transfer cells" (Schmidt et al., 2003). Recentemente è stato osservato che condizioni di carenza di ferro possono determinare l'accumulo di trascritti di specifiche isoforme dell'enzima nelle radici (Santi et al., 2005). L'aumento di attività dell'enzima è rilevante ai fini dell'acquisizione del ferro, non solo per la solubilizzazione del micronutriente alla rizosfera, ma anche perché attraverso la diminuzione del pH apoplastico facilita il funzionamento della Fe(III)-chelato riduttasi del plasmalemma radicale; l'attività della PM H^+ -ATPasi potrebbe anche influenzare l'espressione di *IRT1* e *FRO2*, che risulta promossa da valori esterni di pH bassi (Ling et al., 2005).

I meccanismi di acquisizione del ferro nelle graminacee (Strategia II) prevedono il rilascio alla rizosfera di considerevoli quantità di aminoacidi non proteinogenici, chiamati fitosiderofori, capaci di solubilizzare il ferro da fonti scarsamente solubili e di legarlo in complessi a elevata stabilità. Il rilascio dei fitosiderofori avviene principalmente nelle zone sub-apicali delle radici; diversamente da quanto riportato per le piante a Strategia I, dove la riduzione del Fe(III) è un pre-requisito per il successivo assorbimento nelle cellule radicali, la Strategia II prevede il coinvolgimento di una proteina trasportatrice in grado di veicolare il complesso Fe(III)-fitosideroforo all'interno delle cellule. Poiché i complessi Fe(III)-fitosiderofori risultano stabili anche a valori di pH del suolo rizosferico superiori a 7, le piante capaci di modificare la rizosfera con questa strategia di acquisizione del ferro possiedono un vantaggio ecologico rispetto alle piante a Strategia I. Infatti, la Strategia I può risultare inefficace in condizioni di valori di pH elevati, quali quelli che si riscontrano nei terreni calcarei. Esperimenti di laboratorio e di campo hanno d'altra parte dimostrato che la presenza di graminacee può prevenire i sintomi della carenza in piante dicotiledoni (Cesco e Rombolà, 2006); è stato messo in luce che questo comportamento è legato all'utilizzo, da parte delle piante a Strategia I, del complesso Fe(III)-fitosiderofori come substrato della Fe(III)-chelato riduttasi del plasmalemma radicale (Cesco et al., 2005).

È inoltre interessante l'osservazione che il rilascio dei fitosiderofori, che sono sintetizzati a partire dall'amminoacido metionina, è fortemente limitato in condizioni di scarsa disponibilità di zolfo (Astolfi et al., 2006).

L'insieme di queste osservazioni indica che la valutazione delle risposte delle radici a variazioni della disponibilità di un nutriente deve tenere necessariamente conto della eterogeneità della composizione ionica della rizosfera.

LE MOLECOLE UMICHE

Modificazioni della fisiologia e dello sviluppo della radice possono essere indotte, al pari dei nutrienti, anche dalla presenza alla rizosfera di composti organici: fra questi le sostanze umiche possono giocare un ruolo rilevante. Queste molecole sono il risultato delle trasformazioni chimiche o biologiche di residui vegetali e animali operate nel suolo dall'attività di microrganismi; i composti chimici che ne derivano, aventi struttura prevalentemente aromatica, sono più stabili dei composti da cui originano.

È stato dimostrato che sostanze umiche estratte dal suolo sono in grado di influenzare il metabolismo dei vegetali attraverso l'interazione con diversi pro-

cessi fisiologici e meccanismi biochimici, stimolando la crescita e aumentando la quantità di nutrienti assorbiti dalla pianta (Varanini e Pinton, 1995).

Modulazioni dell'attività della PM H⁺-ATPasi (Pinton et al., 1999), della sua quantità (Canellas et al., 2002) e dell'espressione di sue specifiche isoforme (Quaggiotti et al., 2004), sono state riportate in piante trattate con frazioni umiche di diversa origine e complessità molecolare. A questo tipo d'azione sono stati ricondotti gli effetti stimolatori sull'assorbimento di diversi nutrienti, quali nitrato, solfato, potassio (Varanini e Pinton, 2001). Un contributo particolare all'acquisizione del ferro può derivare dalla capacità di frazioni solubili a basso peso molecolare di promuovere il processo di acidificazione della rizosfera e di formare con il micronutriente complessi che fungono da substrati per la Fe(III)-chelato riduttasi del plasmalemma radicale (Varanini e Pinton, 2006).

È stato inoltre dimostrato che le sostanze umiche sono in grado di modificare marcatamente la morfologia radicale inducendo la proliferazione di radici laterali, un aumento del diametro della zona subapicale e del numero di peli radicali (Nardi et al., 2002). L'interazione tra la radice e l'ambiente esterno (rizosfera) è amplificata dalla capacità delle radici di produrre peli radicali; la loro funzione principale infatti è quella di aumentare la superficie assorbente consentendo un più efficiente assorbimento di acqua e nutrienti. Sulla base della loro capacità di promuovere lo sviluppo della radice e la proliferazione dei peli radicali, sono state attribuite alle molecole umiche proprietà ormono-simili, e in particolare auxino-simili. In un tentativo di chiarire questo aspetto è stata recentemente valutata la risposta di una serie di mutanti di *Arabidopsis* resistenti ad auxina e caratterizzati da un ridotto numero di peli radicali; è stato osservato che i fenotipi di questi mutanti non potevano essere recuperati dall'applicazione di una frazione umica solubile di ridotte dimensioni molecolari, suggerendo che prodotti funzionali della cascata di segnali collegati all'azione dell'auxina siano richiesti per tradurre la risposta delle cellule radicali alle molecole umiche. È stato d'altra parte osservato che mutanti con difetti nell'iniziazione dei peli radicali, che sviluppano normalmente peli in presenza di auxina, non venivano in alcun modo influenzati dal trattamento con concentrazioni crescenti di molecole umiche, indicando per queste sostanze modalità d'azione diverse dall'ormone (Pinton et al., 2006).

L'interazione con i meccanismi preposti all'assorbimento dei nutrienti, unitamente agli effetti sulla morfologia dell'apparato radicale, suggeriscono un ruolo delle molecole umiche quali segnali capaci di evocare, al pari delle fluttuazioni nella disponibilità dei nutrienti, una risposta nelle radici che si traduce in una maggior capacità di esplorazione del suolo e di acquisizione dei nutrienti.

ABSTRACT

It is known that the chemical composition of the rhizosphere can affect plant growth, influencing the process of nutrient uptake that ensures the plant's adequate development. Plants have evolved mechanisms that allow them to adjust to uneven distributions of the nutrients at the rhizosphere, by altering their root architecture, morphology and functionality: proof of this is their ability to modulate the transmembrane mechanisms for ion transport and release organic molecules into the rhizosphere that can modify the chemical, physical and biological characteristics of the soil. This picture is further complicated by the presence at the rhizosphere of different ions at the same time and of natural substances such as humic molecules that can interfere with the mechanisms for nutrient uptake and those involved in root development. In this short review the effects of changes in nutrient availability and of the presence of humic substances on plasma membrane-bound activities of root cells are discussed. Evidence is provided which supports the role of these rhizospheric components as molecular signals inducing morpho-physiological changes in the roots.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ASTOLFI S. ET AL. (2006): *Sulphur starvation reduces phytosiderophores release by Fe-deficient barley plants*, «Soil Sci. Plant Nutr.», 52, pp. 80-85.
- CESCO S., ROMBOLÀ A.D. (2006): *Nutrient management at the rhizosphere through intercropping*, in «Enc. Plant Crop Sci.», Goodman R.M. (ed), Marcel Dekker, New York, in corso di pubblicazione.
- CESCO S. ET AL. (2005): *Root exudates of grasses improve Fe uptake in a citrus rootstock sensitive to Fe-deficiency*, in *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*, Li C.J. et al. (eds), Tsinghua University Press, Beijing, China, pp. 480-481.
- COLMER T.D., BLOOM A.J. (1998): *A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize*, «Plant Cell Environ.», 21, pp. 240-246.
- CONNOLLY E.L. ET AL. (2003): *Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control*, «Plant Physiol.», 133, pp. 1102-1110.
- CONNOLLY E.L. ET AL. (2002): *Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the level of transcript and protein accumulation*, «Plant Cell», 14, pp. 1347-1357.
- CURIE C., BRIAT J-F. (2003): *Iron transport and signaling in plants*, «Annu. Rev. Plant Biol.», 54, pp. 183-206.
- DELL'ORTO M. ET AL. (2000): *Fe-deficiency response in cucumber (Cucumis sativus L.) roots: involvement of plasma membrane H^+ -ATPase activity*, «J. Exp. Bot.», 51, pp. 695-701.
- FORDE B.G. (2000): *Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation*, «Biochim. Biophys. Acta», 1465, pp. 219-235.
- GAN Y. ET AL. (2005): *Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana*, «Planta», 222, pp. 730-742.
- GIORGIO V. (2006): *Responses of maize roots to sulphur deprivation. Changes in nitrate uptake and involvement of the PM H^+ -ATPase*, PhD Thesis, University of Udine.

- GLASS A.D.M. ET AL. (2002): *The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants*, «J. Exp. Bot.», 53, pp. 855-864.
- HINSINGER P. (2004): *Rhizosphere: Nutrient Movement and Availability*, in «Enc. Plant Crop Sci.», Goodman R.M. (ed), Marcel Dekker, New York, pp. 1094-1097.
- HODGE A. (2004): *The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients*, «New Phytol.», 162, pp. 9-24.
- KOPRIVOVA A. ET AL. (2000): *Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 122, pp. 737-746.
- LING H.Q. ET AL. (2005): *Molecular regulation mechanisms of iron uptake in tomato*, in *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*, Li C.J. et al. (eds), Tsinghua University Press, Beijing, China, pp. 92-93.
- LÓPEZ-BUCIO J. ET AL. (2003): *The role of nutrient availability in regulating root architecture*, «Curr. Opin. Plant Biol.», 12, pp. 161-168.
- MARSCHNER H. (1995): *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd ed., Academic Press, London.
- MARSCHNER H., RÖMHELD V. (1994): *Strategies of plants for acquisition of iron*, «Plant Soil», 165, pp. 375-388.
- MONTE R. ET AL. (2005): *Induction of nitrate uptake and PM H⁺-ATPase activity along the root axis of maize seedlings*, in *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*, Li C.J. et al. (eds), Tsinghua University Press, Beijing, China, pp. 220-221.
- MÜLLER M., SCHMIDT W. (2004): *Environmentally induced plasticity of root hair development in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 134, pp. 409-419.
- NARDI S. ET AL. (2002): *Physiological effects of humic substances on higher plants*, «Soil Biol. Biochem.», 34, pp. 1527-1536.
- PINTON R. ET AL. (2006): *Role of Humic Substances as Rhizospheric Signals Affecting Root Growth and Mechanisms of Nutrient Acquisition*, Proc. XIII International Meeting of IHSS, Karlsruhe, Germany, pp. 45-48.
- PINTON R. ET AL. (2001): *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, Marcel Dekker, New York.
- SANTI S. ET AL. (2003): *Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms*, «J. Exp. Bot.», 54, pp. 1851-1864.
- SANTI S. ET AL. (2005): *Two H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants*, «Plant Physiol. and Biochem.», 43, pp. 287-292.
- SCHMIDT W. ET AL. (2003): *Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells*, «Plant Cell Environ.», 26, pp. 361-370.
- STITT M. (1999): *Nitrate regulation of metabolism and growth*, «Curr. Opin. Plant Biol.», 2, pp. 178-186.
- VARANINI Z. (2004): *Root Membrane Activities Relevant to Plant-Soil Interactions*, in «Enc. Plant Crop Sci.», Goodman R.M. (ed), Marcel Dekker, New York, pp. 1110-1113.
- VARANINI Z., PINTON R. (1995): *Humic substances and plant nutrition*, in *Progress in Botany*, vol. 56, Lüttge U. (ed), Springer Verlag, Heidelberg, pp. 97-117.
- VARANINI Z., PINTON R. (2001): *Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition*, in *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Pinton R. et al. (eds), Marcel Dekker, New York, pp. 141-157.

- VARANINI Z., PINTON R. (2006): *Plant-Soil Relationship: Role of Humic Substances in Iron Nutrition*, in *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, Barton L.L., Abadía J. (eds), Springer Verlag, Heidelberg, pp. 153-168.
- ZHANG H., FORDE B.G. (1999): *An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture*, «Science», 279, pp. 407-409.

PAOLO NANNIPIERI*

I colloqui molecolari tra radici e tra radici e microrganismi: lo stato delle conoscenze attuali e le future ricerche

Prima di affrontare l'argomento del mio contributo, l'ultimo dell'incontro che si è tenuto in questa prestigiosa sede, è importante dire che il sottoscritto e la Prof.ssa L. Giovannetti hanno proposto di organizzare questa iniziativa sui messaggi molecolari dato il notevole sviluppo della tematica negli ultimi anni e la sua importanza scientifica e applicativa. Chiarire i colloqui molecolari tra radici e tra radici e microrganismi che vivono nel suolo non è solo importante per comprendere in modo migliore l'ecologia vegetale, l'ecologia microbica e il sistema suolo-pianta, ma anche perché si possono avere utili indicazioni per mettere a punto interventi pratici per migliorare la produzione agraria e forestale e contribuire alla protezione dell'ambiente. È necessario dire che gli "speakers" che mi hanno preceduto sono ricercatori conosciuti a livello internazionale per il contributo importante delle loro ricerche come testimoniato da pubblicazioni e rassegne su libri e riviste internazionali.

Nella prima parte della mia presentazione discuterò la complessità di eventi biochimici della pianta coinvolta nelle simbiosi con gli azoto fissatori, per controbilanciare almeno in parte le relazioni che mi hanno preceduto e che hanno discusso gli aspetti microbici. Inoltre è importante sottolineare che a livello didattico e di ricerca si presta e si è prestato in genere un'attenzione maggiore agli eventi microbici che a quelli vegetali.

Infine voglio sottolineare che la mia attenzione sulla problematica dei colloqui molecolari tra radici e tra radici e microrganismi si è sviluppata negli ultimi anni dopo aver curato in qualità di editore insieme a Roberto Pinton e Zeno Varanini, della Università di Udine, il primo libro (*The rhizosphere*).

* Dipartimento della Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Firenze

Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface, Marcel Dekker, New York, 2001) che ha discusso la complessità biochimica e la varietà di composti organici, presenti sul rizopiano e nel suolo rizosferico. Con nostra sorpresa la casa editrice ci chiese, circa un anno fa, di preparare la seconda edizione, motivando tale invito con il buon successo del libro. Successivamente leggendo i capitoli della nuova edizione, e in modo particolare quello di Perry et al. (2007), un gruppo di ricercatori che operano in diversi centri di ricerca di Fort Collins in Colorado, USA, mi sono accorto che in un breve intervallo di tempo c'era stato un notevole sviluppo di conoscenze sui messaggi molecolari nel suolo rizosferico.

Quando una leguminosa viene infettata dallo specifico rizobio si ha la repressione del sistema di difesa della pianta a causa di lipopolisaccaridi (LPS) secreti dal rizobio. Inoltre si verifica una serie di eventi, discussi nella rassegna di Werner (2007), tra i quali si ha un influsso di Ca^{2+} che agisce da messaggero secondario dentro le cellule vegetali. Viene attivata una calmodulina nucleare, che a sua volta attiva due geni responsabili della sintesi di proteine GRAS, dal nome del ricercatore che per primo le ha identificate. Le proteine GRAS sono tipiche dei vegetali ma non degli organismi animali o procarioti (Bolle, 2004). Nella *Arabidopsis* ne sono state identificate 33. Queste proteine sono composte da 400-700 aminoacidi con la parte della molecola C terminale che è la più conservata come struttura, mentre la parte N terminale è quella variabile. Queste proteine oltre a giocare un ruolo nello sviluppo dei noduli, sono importanti in altri processi vegetali quali lo sviluppo radicale, lo sviluppo del meristema apicale, e lo sviluppo della meiosi (Bolle, 2004).

Il risultato finale della sequenza di eventi che si verificano nella cellula vegetale è la formazione di una struttura complessa nelle quali i simbiosomi funzionano in perfetta sinergia con gli altri organelli cellulari. Ad esempio, nella cellula *Glicine max* 10.000 simbiosomi sono attivi per circa 2 settimane e la loro attività è coordinata con quella degli organelli cellulari della cellula vegetale (Werner, 2007).

Tuttavia i colloqui molecolari non interessano solamente i microrganismi benefici che effettuano simbiosi, come gli azoto fissatori, ma anche batteri che hanno effetti positivi sulla fisiologia vegetale attraverso diversi meccanismi (emissione di fitormoni, azione di controllo verso germi patogeni per la pianta, ecc.); questi batteri vengono indicati con il nome inglese di «plant growth promoting rhizobacteria» (Perry et al., 2007). Colloqui molecolari possono anche interessare microrganismi patogeni per la pianta. Infine i colloqui molecolari possono aversi tra radici della stessa specie o tra radici di specie diverse e talvolta possono interessare anche altri organismi. Tra le comunicazioni

radicali di tipo positivo vi sono quelle che diminuiscono l'appetibilità delle foglie agli erbivori (Perry et al., 2007). Le fitossine secrete da alcune specie vegetali inibiscono la germinazione e la crescita di altre piante ma anche l'appetibilità delle foglie agli erbivori (Perry et al., 2007). Gli afidi che utilizzano come nutriente gli zuccheri del floema di *Hordeum vulgare L.*, non attaccano le foglie di questa pianta quando sono trattate con la carbolina, una fitotossina presente negli essudati radicali di *E. repens* (Glinwood et al., 2003). Si è accertato che la fitossina da sola non agisce in modo negativo sugli afidi ma la sua azione si manifesta quando interagisce con *Hordeum vulgare L.* La presenza di erbivori su una pianta induce la secrezione nella stessa a livello radicale di particolari composti o l'emissione di composti volatili e tali sostanze comunicano ad altre piante la presenza di erbivori (Bruin e Sabellis, 2001). Nel caso di *Vicia faba L.*, quando le foglie sono attaccate dall'afide (*Acyrtosiphon pisum*) esse rilasciano delle sostanze volatili che attirano un parassitoide dell'afide, *Aphidius ervi* (Du et al., 1998).

Considerando la competizione per le risorse presenti nel terreno, è ragionevole ipotizzare che le radici di una pianta non devono esplorare il terreno già esplorato da altre radici della stessa pianta. Infatti i messaggi molecolari nella rizosfera possono guidare la "navigazione" delle radici, permettendo alla pianta di localizzare radici di piante diverse e anche radici di piante della stessa specie (Perry et al., 2007).

Tra le interazioni di tipo negativo vi sono quelle dovute a fitotossine con effetti interspecifici (allamoni) o intraspecifici (Perry et al., 2007). Occorre precisare che l'autotossicità si verifica nel caso di specie vegetali coltivate nello stesso appezzamento di terreno anno dopo anno; così le piantine di *Aparagus officinalis*, il comune asparagio secernono delle sostanze che inibiscono la germinazione dei semi della stessa pianta (Young, 1984); l'autoinibizione ha invece un effetto positivo per la dinamica della popolazione in oggetto e si basa sulla secrezione di composti allelopatici (Perry et al., 2007). Per quanto riguarda gli effetti tra specie diverse, si conoscono diverse sostanze che agiscono a diversi livelli dello sviluppo della pianta, inibendo la germinazione, la crescita radicale, la crescita del germoglio, ecc. Queste sostanze si distinguono oltre che per i loro effetti, anche per la loro struttura chimica e il modo in cui sono prodotte; infatti possono essere rilasciate come essudati radicali, come sostanze dilavate da tessuti vegetali vivi o morti in decomposizione, come composti volatili, ecc. (Perry et al., 2007).

Un caratteristico colloquio molecolare si svolge tra la pianta parassita *Striga* e alcune piante ospiti. La *Striga* è un parassita obbligatorio e non è capace di sopravvivere per un periodo maggiore di 5 giorni senza attaccarsi alla pian-

ta ospite (Palmer et al., 2004; Perry et al., 2007). I semi infatti sono piccoli, hanno una limitata riserva di zuccheri, e germinano solo se sono in presenza di segnali dalla pianta ospite, in genere essudati radicali che variano a seconda della specie vegetale. Nel caso del sorgo, una delle specie di interesse agrario attaccate da questa parassita vegetale, il segnale molecolare è costituito dalla xenognosina mentre la xenognosina e un'altra sostanza che stimola la germinazione della *Striga*, ambedue rilasciate da *Zea mays L.*, sono instabili (Fate e Lynn, 1996; Palmer et al., 2004). Questo è un vantaggio perché le sostanze stimolatrici non possono accumularsi e quindi dare dei messaggi falsi di presenza della pianta ospite. Il resorcinolo rilasciato da *Zea mays L.* rende stabili gli stimolatori della germinazione così da prolungarne la loro attività e renderli efficaci. Una volta che i semi sono germinati le piantine devono produrre velocemente delle strutture radicali specializzate (*Haustorial formation*) per attaccarsi alla pianta ospite, penetrare nell'epidermide e poi connettersi ai vasi della stessa. Anche qui sono in gioco una serie di messaggi molecolari che preparano da una parte la pianta ospite e dall'altra favoriscono lo sviluppo di queste nuove strutture nella pianta parassita. Sia la pianta ospite che quella parassita producono, ad esempio, acqua ossigenata che è necessaria per l'attività della perossidasi che porta alla formazione di benzochinoni, necessari per lo sviluppo delle strutture radicali della pianta parassita.

Si è scoperto di recente che le piante possono interferire nel “quorum sensing” dei germi patogeni. Come è stato discusso dalla Prof L. Giovanetti le cellule microbiche comunicano tra di loro mediante sostanze, in genere derivati della omoserina lattone (Pinton et al., 2001). I patogeni prima dell'attacco alla pianta devono raggiungere un certo numero di cellule, e questo viene comunicato mediante “quorum sensing”. Alcune piante come il fagiolo, la soia e il pomodoro possono interferire con il “quorum sensing” di patogeni. Ad esempio, gli essudati radicali del fagiolo inibiscono la sintesi della proteasi e di un antibiotico nel patogeno *Chormobacterium violaceum* (Perry et al., 2007).

È importante sottolineare che non è sufficiente il rilascio dello specifico composto da parte delle radici perché il colloquio molecolare abbia successo. Infatti il sito di secrezione deve essere appropriato, il composto non deve essere degradato da microrganismi opportunisti, o trasformato abioticamente o assorbito dai colloidi del suolo e inoltre il composto deve raggiungere il microrganismo o la radice bersaglio. È probabile che *in situ* si abbia l'azione combinata di più essudati radicali che agiscono in sinergia con il composto coinvolto nel colloquio molecolare, come abbiamo visto per il resorcinolo secreto dal mais che stabilizza le sostanze stimolatrici della germinazione dei

semi della pianta parassita *Striga*. Ad esempio, un'azione sinergica potrebbe essere quella di inibire i microrganismi opportunisti o competitori, attrarre i microrganismi bersaglio, stabilizzare il composto in oggetto se instabile o proteggerlo dall'azione degradatrice di enzimi extracellulari.

In conclusione sono stati fatti dei notevoli progressi nella comprensione dei colloqui molecolari tra radici e tra radici e microrganismi del suolo. Tuttavia la maggior parte di queste conoscenze sono state ottenute in laboratorio in sistemi semplici nei quali si è cercato di isolare le diverse variabili, studiando solamente i due organismi coinvolti nel colloquio senza considerare che *in situ* la popolazione microbica è caratterizzata da un'ampia diversità (si parla in media di 6000 specie microbiche presenti in un grammo di suolo; Torsvik et al., 1996; Nannipieri et al., 2003), e quindi da una vasta gamma di funzioni metaboliche, e senza considerare la presenza della parte solida del suolo, in modo particolare le superfici adsorbenti dei colloidi del suolo. Ulteriori ricerche sono necessarie per caratterizzare meglio la complessità biochimica della pianta coinvolta in questi colloqui perché in genere si è prestato una maggiore attenzione agli eventi biochimici del partner microbico. Infine le ricerche sui colloqui molecolari non hanno una sola valenza scientifica ma possono avere notevoli implicazioni pratiche perché il miglioramento delle conoscenze può consentire di metter a punto delle pratiche agronomiche e forestali che consentano di favorire interazioni positive ed evitare le interazioni negative con conseguenze positive per la produttività agraria e forestale e la protezione dell'ambiente.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BOLLE C. (2004): *The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development*, «Planta», 218, pp. 683-692.
- BRUIN J., SABELIS M.W. (2001): *Meta-analysis of laboratory experiments on plant-plant information transfer*, «Biochemical Systematics and Ecology», 29, p. 1089.
- DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., RAO R., PENNACCHIO F. (2002): *Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi**, «Journal Chemical Ecology», 24, p. 1355.
- FATE G.D., LYNN D.G. (1996): *Xenoglossina methylation is critical in defining the chemical potential gradient that regulates the spatial distribution in *Striga* pathogenesis*, «Journal Chemical Society», 118, p. 11369.
- GLINWOOD R., PETTERSSON J., AHMED E., NINKOVIC V., BIRKETT M., PICKETT J. (2003): *Change in acceptability of barley plants to aphids after exposure to allelochemicals from couch-grass (*Elytrigia repens*)*, «Journal Chemical Ecology», 29, p. 261.
- NANNIPIERI P., ASCHER J., CECCHERINI M.T., LANDI L., PIETRAMELLARA G., RENELLA G. (2003): *Microbial diversity and soil functions*, «European Journal Soil Science», 54, pp. 655-670.

- PALMER A.G., GAO R., MARESH J., ERBIL W.K., LYNN D.G. (2004): *Chemical biology of multihost/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation*, «Annual Review of Phytopathology», 42, p. 439.
- PERRY L.G., ALFORD E.R., HORIUCHI J.-I., PASCHKE M.W., VIVANCO J.M. (2007): *Chemical Signals in the rhizosphere: root-root and root-microbes communication*, in Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds), *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, New York, in corso di pubblicazione.
- PINTON R., VARANINI Z., NANNIPIERI P. (2001): *The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms*, in Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds), *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, New York, pp. 1-17.
- TORSVIK V.L., SØRHEIM R., GOKSOYR J. (1996): *Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review*, «Journal of Industrial Microbiology», 17, pp. 170-178.
- WERNER D. (2007): *Biochemistry and ecology of the Rhizobium-legume symbiosis*, in Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds), *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, New York, in corso di pubblicazione.
- YOUNG C.C. (1984): *Autointoxication in root exudates of Aspergillus officinalis L.*, «Plant and Soil», 82, p. 247.