

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 meristematici 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 micorrizate 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 simbionte 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 simbionte. 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/moluschi 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.
- BIANCOTTO 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.
- BIANCOTTO 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.
- BIANCOTTO 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.
- BIANCOTTO 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.