

**UNIVERSITA' DI PISA
FACOLTA' DI AGRARIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE VEGETALI E MICROBICHE**

**Monitoraggio molecolare di funghi micorrizici arbuscolari
in radici di *Medicago sativa***

RELATORE

Prof.ssa Manuela Giovannetti

CORRELATORE

Prof. Andrea Cavallini

CANDIDATO

Giovanni Cafà

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Le simbiosi	5
1.2 Le simbiosi micorriziche	6
1.3 Le micorrize arbuscolari	11
1.4 Preferenza d'ospite dei funghi AM	18
1.5 Filogenesi e tassonomia dei funghi AM	20
1.6 Identificazione dei funghi AM	22
1.7 Metodi molecolari per l'identificazione di funghi AM	24
1.8 DNA ribosomale per identificazione molecolare	25
1.9 Monitoraggio molecolare di funghi AM	28
1.10 Studio della diversità funzionale e caratterizzazione molecolare degli isolati fungini IMA1 e AZ225C della specie <i>G. mosseae</i> in campi sperimentali di <i>M. sativa</i>	29
2. SCOPO DEL LAVORO	31
3. MATERIALI E METODI	32
3.1 Materiale fungino e vegetale	32
3.1.1 <i>Materiale fungino</i>	32
3.1.2 <i>Materiale vegetale</i>	32
3.2 Estrazione del DNA da radici	33
3.3 Amplificazione del DNA fungino tramite PCR	35
3.3.1 <i>Amplificazione con i primers NS31-LSUGlom1</i>	35
3.3.2 <i>Amplificazione con i primers AML1-LSUGlom1</i>	36
3.4 Purificazione dei prodotti di PCR	37
3.5 Ligazione e clonaggio	37
3.6 Selezione mediante PCR delle colonie ricombinanti (colony PCR)	39
3.7 Nested PCR dei prodotti positivi della "colony PCR"	40

3.8 Analisi RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	40
3.9 Estrazione del DNA plasmidico dai cloni con profili di RFLPs rappresentativi	41
3.10 Sequenziamento	42
3.11 Analisi statistiche per comparare la diversità e struttura AMF ottenuta mediante RFLPs	42
3.12 Analisi delle sequenze	43
4. RISULTATI	44
4.1 Amplificazione della regione SSU-ITS-LSU dei funghi AM con i primers NS31/LSU-Glom1 e AML1/ LSU-Glom1	44
4.2 Ricchezza e variabilità fungina AM tramite RFLPs a due mesi dalla germinazione delle piante di <i>M. sativa</i>	45
4.3 Ricchezza e variabilità fungina AM tramite analisi delle sequenze SSU a due mesi dalla germinazione delle piante di <i>M. sativa</i>	54
4.4 Analisi della porzione ITS2 delle sequenze di <i>G. mosseae</i> presenti nelle radici di <i>M. sativa</i>	60
5. DISCUSSIONE	62
6. BIBLIOGRAFIA	69
ALLEGATI	89

ABBREVIAZIONI

AM	micorrize arbuscolari
AMF	funghi micorrizici arbuscolari
bp	base pair
DNA	acido desossiribonucleico
IGS	Intergenic spacer
ITS	internal transcribed spacer
LSU	large ribosomal subunit
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SSU	small ribosomal subunit
T-RFLP	terminal-restriction fragment length polymorphism
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis

SEQUENZE DEI PRIMERS

AM1	5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3'
AML1	5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3'
LSU-Glom1	5'-CTTCAATCGTTTCCCTTTCA-3'
NS31	5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

1. INTRODUZIONE

1.1 Le simbiosi

La simbiosi (dal greco: $\sigma\upsilon\nu$ = insieme; $\beta\iota\omicron\varsigma$ = vita) nei termini più generici è la stretta relazione fra oggetti, azioni o persone diverse, per trarne un beneficio reciproco. Il termine fu coniato da Heinrich Anton de Bary nel 1879 per qualificare la natura dei licheni, ch'egli dimostrò essere un'associazione fra un'alga e un fungo. Egli definì la simbiosi come “... *Zusammenleben ungleichnamiger Organismen* ...” cioè “...il vivere insieme di organismi con diverso nome...”.

La simbiosi è una condizione estremamente diffusa tra gli organismi viventi e coinvolge organismi appartenenti a tutti i regni del vivente. Si trovano simbiosi tra pesci e anemoni di mare, tra gli afidi e alcuni batteri o ancora tra piante e funghi o piante e batteri. L'uomo stesso partecipa ad alcune associazioni simbiotiche con batteri. Nella maggior parte degli ambienti naturali la simbiosi costituisce la normalità. In ambienti terrestri, circa l'85-90% delle specie vegetali forma simbiosi con funghi del suolo (simbiosi definite micorrize).

Nel rapporto di simbiosi si parla in genere di un partner ospite e di uno simbionte. Molto semplicisticamente, l'ospite è il partner più grande, mentre il simbionte è quello più piccolo.

De Bary (1887) definì diversi tipi di simbiosi, classificando vari livelli di interazione tra ospite e simbionte: il commensalismo per indicare associazioni tra specie animali o vegetali nelle quali un organismo condivide il cibo con l'altro, ed in cui l'uno non arreca danno all'altro; il parassitismo in cui l'ospite subisce danni rilevanti, fino alla morte nei casi più estremi; il mutualismo in cui entrambi i partners ricevono vantaggi dall'associazione.

Nel tempo, il termine simbiosi è stato sempre più utilizzato per indicare fenomeni di mutualismo, fino all'affermazione del concetto di

“simbiosi mutualistiche”, ovvero il vivere insieme, con mutuo beneficio, di organismi diversi (Smith e Douglas, 1987).

In base alla durata dell'associazione si possono distinguere simbiosi cicliche e simbiosi permanenti.

Nella simbiosi ciclica il simbionte viene acquisito ad ogni generazione dall'ospite e quindi i partners hanno vita autonoma. Esempi di questo tipo di associazione sono: simbiosi tra piante e azotofissatori (rizobi e cianobatteri); simbiosi micorriziche, simbiosi tra funghi e cianobatteri.

Nella simbiosi permanente il simbionte vive esclusivamente in associazione con l'ospite, come ad esempio nella simbiosi tra batteri e organelli cellulari (cloroplasti e mitocondri). Quest'ultimo tipo di simbiosi è quella che, secondo l'ipotesi endosimbiontica di Lynn Margulis (1981), ha permesso alle cellule eucariotiche l'evoluzione da organismi anaerobi unicellulari.

1.2 Le simbiosi micorriziche

Il termine micorrizza, dal greco *mykos* “fungo” e *rhizon* “radice”, si riferisce ad una tipica associazione simbiotica mutualistica che si instaura tra migliaia di funghi del suolo e la maggior parte delle radici delle piante terrestri (Smith e Read, 2008).

Tale termine fu utilizzato per la prima volta nel 1885 da Frank, patologo tedesco, per definire l'associazione tra fungo e pianta, sebbene fosse già stata osservata fin dal 1847 da Reissek che descrisse la presenza di ife fungine nelle cellule radicali di diverse angiosperme (Smith e Read, 2008). Poi, nel 1881, Kamieski descrisse l'associazione tra monotropa e funghi terricoli che formavano uno strato di micelio attorno alle radici. Nel 1883 Gibelli pubblicò delle illustrazioni di ectomicorrize del castagno, nell'ambito di uno studio sulla malattia dell'inchiostro condotto presso l'Orto Botanico di Torino,

descrivendo il fungo come innocuo e non responsabile di patologie (Smith e Read, 2008).

Più del 90% delle specie vegetali in condizioni naturali è micorrizzato. Inoltre sono stati trovati resti fossili che confermano l'esistenza delle endomicorrize già 460 milioni di anni fa, in concomitanza con all'apparizione dei vegetali sulle terre emerse. Al contrario, negli ambienti antropizzati le micorrize sono spesso assenti oppure presenti in forma molto ridotta, molto probabilmente a causa dell'inquinamento dei terreni (Giovannetti e Gianinazzi-Pearson, 1994, Jansa *et al.*, 2002, Johnson, 1993).

I funghi micorrizici costituiscono un vero e proprio apparato assorbente ausiliario: infatti, dopo aver colonizzato la radice, continuano a crescere esplorando per molti metri il terreno circostante mediante il micelio e, attraverso tali ife extraradicali assorbono nutrienti minerali che sono poi trasportati e rilasciati all'interno delle radici della pianta ospite (Giovannetti e Avio, 2002).

A seconda della specie fungina e della pianta coinvolta si distinguono diversi tipi di micorrize, classificate in base alle loro differenze morfologiche, fisiologiche e funzionali. I più importanti tipi sono rappresentati dalle ectomicorrize, le ectoendomicorrize e le endomicorrize (Smith e Read, 2008).

Nelle ectomicorrize il fungo non penetra mai all'interno delle cellule dell'ospite. Le ife fungine formano uno spesso strato attorno alle radici, detto mantello o *micoclena* (Fig. 1). Il colore, lo spessore e la morfologia del mantello possono variare a seconda delle specie fungine. Dal mantello le ife si insinuano tra le cellule della corteccia radicale, formando un intreccio intercellulare, il *reticolo di Hartig*. Sempre dal mantello si diparte una fitta rete di ife esterne e cordoni miceliari che si estendono notevolmente nel suolo circostante, e in condizioni appropriate possono formare le strutture riproduttive (carpofori). Generalmente la radice micorrizzata risulta profondamente

trasformata: la crescita apicale è bloccata, l'apice si biforca, e assume una forma coralloide. Il mantello fungino spinto dalle radichette secondarie non si rompe, ma si estende entrando in attiva proliferazione cellulare, inglobando le nuove radici laterali. Nella radice micorrizata scompaiono i peli radicali. Le ectomicorrize sono essenzialmente formate da alcune migliaia di specie fungine appartenenti a diversi generi di Basidiomycota come *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Russula*, *Suillus*, *Tricholoma*, e agli Ascomycota del genere *Tuber*, che formano simbiosi con specie arboree come la quercia, il pioppo, il tiglio, il cisto ed il nocciolo) (Molina *et al.*, 1992).

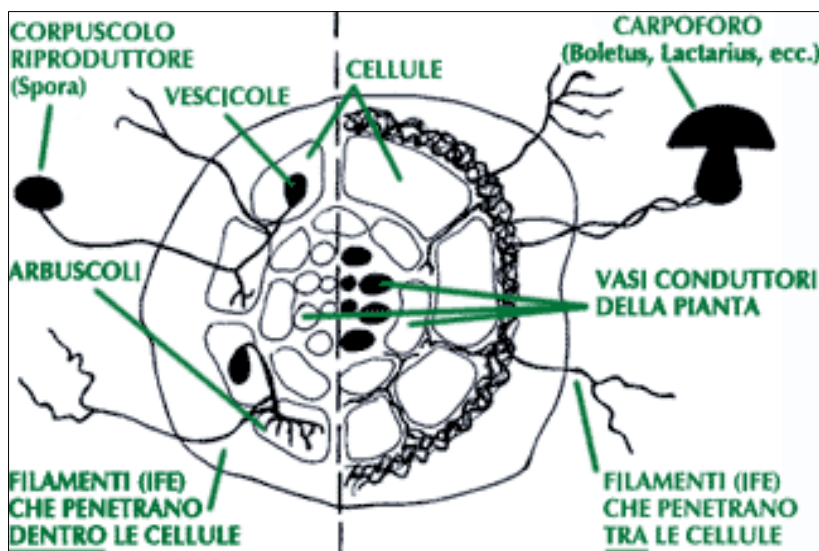


Figura 1. Rappresentazione schematica dei due principali tipi di simbiosi micorriziche: sulla sinistra la simbiosi endomicorrizza e sulla destra la simbiosi ectomicorrizza (digilander.libero.it/dipende60/le_micorrize.htm)

Le ectoendomicorrize hanno molte caratteristiche proprie delle ectomicorrize, quali la presenza del mantello ifale e del *reticolo di Hartig*, ma differiscono da esse per la capacità del fungo di penetrare e svilupparsi intracellularmente nel primo strato corticale. Questo tipo di micorrizza è stato ritrovato in alcuni generi di piante appartenenti

all'ordine delle Ericales, tra cui *Arbutus* e *Arctostaphylos*, (micorrize arbutoidi), *Monotropa* (micorrize monotropoidi), e *Pyrola*. I funghi in grado di formare micorrize arbutoidi in genere formano simbiosi ectomicorriziche quando colonizzano altre piante ospiti (Giovannetti e Lioi, 1990). Sono state ritrovate ectoendomicorrize anche in giovani piantine di *Pinus*, *Picea* e *Larix* che normalmente sono ectomicorriziche. Le ectoendomicorrize sono principalmente formate da funghi appartenenti ai Basidiomycota e dai tipi che più comunemente formano ectomicorrize.

Le endomicorrize sono così definite perché, a differenza delle ectomicorrize, il fungo penetra all'interno delle cellule dell'ospite e non produce la micoclona (Fig. 1). Inoltre sono più antiche delle ectomicorrize (Taylor *et al.*, 1995). Nelle endomicorrize le spore si sviluppano fino a raggiungere la radice, e la colonizzano penetrando sia attraverso gli spazi intercellulari sia direttamente nelle cellule. Il fungo si diffonde attraverso le cellule corticali, senza invadere mai il cilindro centrale e né le cellule dell'apice radicale. All'interno delle cellule le ife si diramano a formare strutture ramificate, gli arbuscoli, responsabili degli scambi nutrizionali tra i due simbionti: la pianta cede carboidrati prodotti attraverso la fotosintesi e il fungo a sua volta cede minerali assorbiti dal suolo circostante. Altre strutture prodotte dalle ife fungine sono le vescicole, rigonfiamenti tondeggianti inter- o intracellulari, che svolgono funzioni di accumulo di granuli di grasso con funzione di riserva (Smith e Read, 2008). Anche se la radice non subisce variazioni morfologiche notevoli come avviene per le ectomicorrize, l'apparato radicale risente della presenza del fungo: possono infatti variare il grado di ramificazione e le dimensioni delle radici stesse, fino ad aumentare di centinaia di volte (Smith e Read, 2008). A seconda delle specie di piante e funghi coinvolti nelle simbiosi si distinguono tre tipi di endomicorrize: ericoidi, orchidoidi e arbuscolari.

Nelle micorrize ericoidi il fungo simbiote colonizza circa l'80% del tessuto radicale, penetrando nelle cellule corticali e formando avvolgimenti chiamati "coils" (gomitoli). Questo tipo di endomicorriza interessa specie di piante appartenenti alle *Ericales*, come *Erica*, *Calluna*, *Rhododendron* e *Vaccinium*. Le *Ericales* sono piante che vivono in terreni acidi delle brughiere e in ambienti in cui la maggior parte dei nutrienti del suolo è in forma organica, diventa quindi fondamentale il ruolo svolto da questi funghi per la mobilitazione di tali nutrienti al fine di renderli disponibili per la pianta. I simbionti fungini più frequentemente isolati sono Ascomycota appartenenti a *Hymenoscyphus ericae* o forme mitosporiche del genere *Oidiodendron* (Straker, 1996).

Le micorrize orchidoidi sono invece caratteristiche di piante economicamente importanti appartenenti alla famiglia delle *Orchidaceae*. Le orchidee sono tra le piante maggiormente dipendenti dalla simbiosi micorrizica, infatti la simbiosi è necessaria ai fini della germinazione dei semi e della crescita delle plantule. I funghi simbionti forniscono gli zuccheri, i nutrienti e le vitamine necessarie per i primi stadi di sviluppo della pianta, poichè i semi delle orchidee contengono poche cellule e scarsissima sostanza di riserva. Il fungo penetra attraverso il sospensore dell'embrione, traslocando ad esso i composti glucidici di cui il seme è privo, e determinando una immediata stimolazione della crescita. Lo sviluppo del simbiote si riduce con l'avanzamento della differenziazione dell'embrione, fino a collocarsi nel protocormo, lo stadio giovanile della pianta. Ma di qui il fungo non passa nelle giovani radici che invece vengono infettate dal micelio proveniente dal suolo circostante. I simbionti fungini delle endomicorrize orchidoidi sono rappresentati da *Rhizoctonia* e altri Basidiomycota come *Marasmius*, *Fomes*, *Armillaria*.

L'ultimo tipo di simbiosi endomicorrizica è rappresentato dalle micorrize arbuscolari.

1.3 Le micorrize arbuscolari

Le micorrize arbuscolari (AM) si trovano in oltre l'80% delle specie vegetali e nella maggior parte delle piante coltivate. Il nome deriva dalle caratteristiche strutture ifali ramificate ad alberello (arbuscoli), che il fungo simbionte forma all'interno delle cellule corticali delle radici delle piante ospiti. Originariamente il termine usato per descrivere tali associazioni era micorrize vescicolo-arbuscolari (VAM), ma fu osservato che non tutti i generi e specie di funghi avevano la capacità di formare le vescicole all'interno delle radici, e fu quindi preferito adottare la definizione di micorrize arbuscolari (Berch, 1987).

Le simbiosi AM sono formate da funghi terricoli appartenenti al Phylum Glomeromycota, che hanno un importante ruolo nella nutrizione delle piante, fertilità del suolo e mantenimento della stabilità e biodiversità nelle comunità vegetali, sia in ecosistemi naturali che in agro-ecosistemi (Schußler *et al.*, 2001). I funghi AM sono stati riconosciuti e descritti nella seconda metà del 1900. Nel 1953, con un lavoro di Barbara Mosse, si ebbe un' importante svolta nello studio e descrizione dei funghi AM inaugurando così il periodo delle moderne ricerche sulle micorrize. Mosse mostrò che piante di fragola erano colonizzate da una specie di fungo endofita del genere *Endogone*, inizialmente denominato *Endogone mosseae* in suo onore e successivamente chiamato *Glomus mosseae* (Mosse, 1953).

Numerosi studiosi approfondirono le osservazioni su questi funghi simbiotici, e mediante l'inoculazione su diverse specie di piante dimostrarono che i funghi appartenenti alle *Endogonaceae* formavano simbiosi AM e VAM, e che tali funghi non mostravano una stretta specificità d'ospite (Mosse, 1956). A questo punto, si rendeva necessaria una prima classificazione Linneana delle specie che, infatti, fu sviluppata da Gerdemann e Trappe nel 1974. Successivamente furono studiati molti aspetti generali sullo sviluppo e sulle funzioni di

tali simbiosi (Harley e Smith, 1983) e aumentò l'interesse verso lo studio della diversità esistente nelle AM e delle interazioni cellulari e molecolari tra i simbionti (Giovannetti e Gianinazzi-Pearson, 1994).

Numerosi esperimenti in laboratorio e in campo hanno contribuito a dimostrare grandi risposte di crescita delle piante all'inoculazione di endofiti fungini AM rispetto alle piante non micorrizzate, mostrando inoltre che la "performance" di ogni specie e isolato differisce a seconda della specie di pianta ospite e delle condizioni del suolo, che ne influenzano lo sviluppo. Sebbene i simbionti AM non possano crescere in colture axeniche, in assenza dell'ospite, e la conoscenza della loro biologia sia ancora limitata, sono stati studiati i fattori fondamentali che influenzano il loro sviluppo (Abbott e Robson, 1991). Per questi studi sono stati adottati particolari metodi per mantenere ceppi puri, per scopi sperimentali ma anche tassonomici. Il metodo maggiormente utilizzato è l'uso di "pot-culture": gli isolati di singoli tipi di spore vengono inoculati in substrati sterili e cresciuti sulle radici di piante ospiti, così che le caratteristiche delle spore, il modo di colonizzazione e gli effetti sulla crescita della pianta possano essere studiati mediante campionamenti sequenziali (Mosse, 1973). Non è infatti possibile generalizzare sul tipo di influenza che un fungo ha sulla pianta in simbiosi, poiché si vengono a stabilire interazioni estremamente complesse tra isolati fungini, pianta ospite, suolo e ambiente. Si può comunque cercare di valutare la "performance", al fine di selezionare buoni endofiti, prendendo in considerazione due specifiche caratteristiche: **l'infettività** e **l'efficienza**. **L'infettività** è la capacità del fungo di stabilire rapidamente un'estesa infezione micorrizica nelle radici delle piante ospiti. Essa è correlata con le complesse relazioni che si instaurano tra suolo, fungo e ospite e che influenzano lo stadio pre-simbiotico del ciclo vitale del fungo, la germinazione, la crescita in assenza dell'ospite, la differenziazione delle strutture infettive e la colonizzazione della radice (Giovannetti e

Gianinazzi-Pearson, 1994; Giovannetti e Avio, 2002). **L'efficienza** invece è intesa come la risposta di crescita della pianta all'inoculazione, ed è condizionata, in termini di produzione della pianta da diversi parametri: capacità del fungo di dare origine ad un'estesa rete ifale che sia in grado di esplorare il suolo, assorbire e traslocare i nutrienti minerali del suolo alla pianta, la vitalità del micelio extraradicale, la percentuale di nutrienti e il loro trasferimento alle cellule ospiti (Giovannetti e Avio, 2002).

I funghi AM sono organismi biotrofi obbligati, poichè il loro ciclo vitale non può completarsi in assenza della pianta ospite, con la quale istaurano una simbiosi di tipo mutualistico: il fungo colonizza la radice e ottiene i composti carboniosi che non è capace di sintetizzare, mentre la pianta riceve nutrienti minerali e acqua (Smith e Read, 2008). Molte specie fungine producono spore nel suolo che sono capaci di germinare e crescere, se presenti adeguate condizioni, ma non sono capaci di produrre un micelio esteso in assenza dell'ospite e la loro crescita cessa dopo 15-20 giorni dalla germinazione se non istaurano una simbiosi funzionale con la radice (Mosse, 1959; Logi *et al.*, 1998; Giovannetti, 2000). Alcuni funghi AM dei generi *Glomus* e *Acaulospora* differenziano vescicole, strutture simili alle spore di diametro di 50-100 µm, formate dentro il cortex radicale, di solito intercellularmente, contenenti lipidi e per questo considerate organi di riserva (Avio e Giovannetti, 2002).

Il processo di formazione delle simbiosi comincia con la germinazione delle spore, residenti nel suolo, in condizioni edafiche favorevoli (pH, temperatura, umidità, nutrienti minerali e organici). La germinazione asimbiotica delle spore dà origine ad un micelio pre-simbiotico, che cresce (~20-30 mm per spora) fino a trovare e riconoscere una radice ospite. Durante la fase pre-simbiotica la pianta ospite rilascia metaboliti, segnali necessari per innescare la crescita fungina e permettere la colonizzazione radicale (Giovannetti e Sbrana,

1998). L'istaurarsi della simbiosi prosegue con la differenziazione delle strutture infettive multinucleate, dette appressori, che possono penetrare tra le cellule epidermiche e attraversare i peli radicali. Studi time-course hanno mostrato che i primi appressori si formano nelle prime 36-48 ore dal momento in cui inizia l'interazione tra le spore germinate e le piante, e il loro numero varia in differenti combinazioni ospite-simbionte (Giovannetti e Citerinesi, 1993). Dopo la penetrazione, comincia la colonizzazione del tessuto parenchimatrico della radice. Lo sviluppo fungino nel cortex radicale avviene sia lungo l'asse longitudinale della radice che all'interno delle cellule per formare, gli arbuscoli, prodotti da una ramificazione massiva dell'ifa dopo la penetrazione della parete cellulare. L'ifa ramificata si trova tra la membrana plasmatica delle cellule radicali e il fungo. A livello di questa interfaccia pianta-fungo avvengono gli interscambi nutrizionali. Anche lo sviluppo degli arbuscoli è influenzato da diversi fattori quali lo stato nutritivo e fenologico dell'ospite e la luce (Smith e Gianinazzi-Pearson, 1988). La vita degli arbuscoli è molto breve, inferiore ai 15 giorni: nel giro di 7-10 giorni si formano, degenerano, si svuotano e collassano, formando masse amorfe, ben visibili al microscopio elettronico, nella cellula ospite che sopravvive (Bonfante e Giovannetti, 1982).

Una volta stabilita la simbiosi le ife del fungo, grazie ai composti carboniosi forniti dalla pianta ospite, possono estendersi esternamente alla radice formando un micelio cenocitico extraradicale e possono esplorare un volume di terreno normalmente inaccessibile alle radici (Smith e Read, 2008). In questo modo la pianta aumenta considerevolmente la superficie di assorbimento, e di conseguenza la capacità di assorbimento dei nutrienti e dell'acqua. Infine il fungo è capace di completare il suo ciclo vitale con la formazione di nuove spore (Giovannetti, 2000).

Le spore prodotte dai funghi AM sono asessuali, multinucleate, sono formate dalla differenziazione dell'ifa vegetativa, e possono essere formate all'interno della radice (*Glomus intraradices*) o nel suolo (Biermann e Lindermann, 1983). Le spore nel terreno possono trovarsi in uno stato di quiescenza, che a differenza delle spore definite dormienti, sono in grado di germinare quando le condizioni chimico-fisiche richieste dalla specie sono idonee (Tommerup, 1983). La dormienza rappresenta un parametro importante, da prendere in considerazione nella selezione degli endofiti da utilizzare nelle sperimentazioni pratiche, in quanto essa influenza la competitività tra specie ed isolati fungini. Un'altra struttura prodotta da alcuni funghi AM sono le cellule ausiliarie, simili alle vescicole ma più piccole. Tali cellule sono prodotte nel suolo ma la loro funzione non è ancora conosciuta. Esse sono formate da alcune specie appartenenti alla famiglia delle Gigasporaceae.

A seconda delle specie di piante ospiti si possono riscontrare due gruppi anatomici di colonizzazione micorrizica: il tipo *Arum* ed il tipo *Paris* (Smith e Read, 2008).

Il tipo *Arum* è il più studiato ed è caratterizzato dall'espansione del fungo AM attraverso lo spazio apoplastico tra le cellule radicali corticali. Le vescicole sono intercellulari o intracellulari e gli arbuscoli sono prodotti all'apice dei rami ifali intracellulari. Il tipo *Paris* è caratterizzato dall'assenza delle ife intercellulari, e da uno sviluppo simplastico del fungo, che si espande da una cellula all'altra entro il cortex, e forma molti coils ifali intracellulari e arbuscoli inseriti lungo i coils (Smith e Read, 2008). La formazione dell'infezione AM di tipo *Arum* o *Paris* sembra essere sotto il controllo genetico della pianta ospite (Gerdemann, 1965; Jacquelinet-Jeanmougin e Gianinazzi-Pearson, 1983; Brundett e Kendrick, 1990; Bedini *et al.*, 2000).

Le piante che ospitano nelle loro radici funghi AM, mostrano non solo una maggiore crescita, dovuta al migliore assorbimento minerale

operato dalle ife fungine che si estendono nel terreno, ma anche una maggiore tolleranza agli stress biotici e abiotici, e quindi un maggior benessere generale, rispetto alle piante non micorrizzate (Smith e Read, 2008).

I benefici che i funghi AM hanno sulle piante, ma anche sulla stabilizzazione del suolo, fa di questi organismi una componente chiave degli ecosistemi naturali e degli agro-ecosistemi. La migliore nutrizione minerale (soprattutto fosfatica) si traduce in una maggiore crescita della pianta (Fig. 2), in particolare nei terreni poveri di elementi minerali. Le piante micorrizzate sono spesso più competitive e tollerano meglio le condizioni di stress rispetto alle piante non micorrizzate. Il fungo a sua volta, grazie alla simbiosi, è in grado di completare il proprio ciclo vitale. Il potenziale d'inoculo può essere ridotto da certe pratiche agricole a causa della rottura del micelio extraradicale (Helgason *et al.*, 1997), come la fertilizzazione e le lavorazioni profonde, o l'assenza di piante ospiti. Per cui, là dove il potenziale d'inoculo naturale è basso, l'introduzione di inoculi AM può essere una strategia vincente.

L'effetto più importante dovuto all'azione della simbiosi AM sulle piante è un incremento dell'assorbimento degli elementi minerali a lenta diffusione nel suolo, soprattutto il fosforo (P), ma anche zinco (Zn) e rame (Cu) (Smith e Read, 2008).

Le altre funzioni attribuite ai funghi AM sono l'induzione della sintesi di ormoni vegetali della crescita (Danneberg *et al.*, 1992; Druge *et al.*, 1992), la protezione dai patogeni (Volpin *et al.*, 1994; Newsham *et al.*, 1995; Kapulnik *et al.*, 1996), l'assorbimento di metalli pesanti (Leyval *et al.*, 1997), la tolleranza allo stress salino (Selvaraj *et al.*, 2004), l'assorbimento di radionuclidi e la protezione da elementi radioattivi (Selvaraj *et al.*, 2004; Selvaraj *et al.*, 2005).

Il P è uno degli macronutrienti chiave richiesti per il metabolismo e la crescita della pianta. Tale elemento gioca un ruolo importante nel



Figura 2. Effetto di crescita differenziale dovuto alla presenza di funghi AM in piante di vite micorrizzate (sinistra) e non micorrizzate (destra), (Giovannetti, 2001).

trasferimento di energia, ed è essenziale nelle macromolecole come nucleotidi, fosfolipidi e zuccheri fosfati (Marschner, 1995). Molto del fosfato inorganico fornito al suolo come fertilizzante, viene subito convertito in forme a bassa solubilità, che risultano poco utilizzabili dalla pianta. L'attività dei microrganismi della rizosfera, attraverso una serie di reazioni di solubilizzazione, rende più solubili i fosfati (Kapoor *et al.*, 1989). Le piante micorrizzate sono capaci di assorbire più fosforo rispetto a quelle non micorrizzate. Il grado di assorbimento dei fosfati da parte delle radici delle piante in crescita è più alto rispetto a quello di diffusione dei fosfati nel suolo; si creano quindi delle zone di depressione da fosfato, cioè punti in cui i fosfati sono assenti e vi è limitata crescita della radice. La crescita della radice della pianta crea quindi una zona di depressione da fosfato causata dal contrasto tra assorbimento di fosfato della pianta e basso grado di diffusione dei fosfati nel suolo. Il micelio extraradicale dei funghi AM esplora il terreno

oltre la zona di depressione alla ricerca di nuovi fosfati solubili (Smith e Read, 2008). Molti esperimenti hanno dimostrato che l'infezione micorrizica produce risposte di crescita simili all'aggiunta di P (Gianinazzi-Pearson e Gianinazzi, 1986; Abbott e Robson, 1984). L'aumento dell'assorbimento di P varia in funzione della quantità di P assimilabile nel suolo, delle specie di piante e degli isolati fungini (Sanders e Tinker, 1971; Sanders e Tinker, 1973; Rhodes e Gerdemann, 1975; Smith, 1982). La migliore efficienza nell'assorbimento del P nelle piante micorrizzate è determinata da numerosi meccanismi, i quali consistono, oltre che nel semplice assorbimento ifale del P inorganico solubile, anche nelle trasformazioni del P non prontamente disponibile, come la liberazione del P inorganico da quello organico e la trasformazione di forme di P inorganico insolubili in forme solubili (Hodge *et al.*, 2001).

E' stato dimostrato da Harrison e Van Buuren (1995) che nelle ife esterne di *Glomus versiforme* è presente un trasportatore ad alta affinità per il fosfato attivo, codificato dal gene *GvPT*. L'espressione di questo gene è stata localizzata in ife del micelio esterno di *G. versiforme* durante associazione micorrizica. Altri geni di trasportatori di fosfati sono stati individuati in *Glomus deserticola* (Chellappan, 2000), dimostrando ancora il ruolo primario dei funghi AM nell'assorbimento dei fosfati.

1.4 Preferenza d'ospite dei funghi AM

L'identità e la diversità dei funghi AM sono fondamentali per la struttura di una comunità vegetale. E' stato dimostrato che specie vegetali rispondono in modo differenziale ai funghi AM presenti, e nello specifico che la diversità dei funghi AM determina la diversità delle piante, la quantità di biomassa e l'apporto di nutrienti (van der Heijden *et al.*, 1998a,b), tanto che possibili cambiamenti nella comunità di

funghi AM potrebbero modificare la comunità vegetale e addirittura un intero ecosistema. A causa dell'impatto che i funghi AM hanno sulla comunità vegetale, risulta molto importante studiarne e investigarne la distribuzione e diversità negli ecosistemi. Inoltre, dato che le interazioni simbiotiche dipendono da fattori genetici legati sia alla pianta che al fungo, lo studio della capacità dei funghi AM di colonizzare e di apportare benefici alla pianta ospite è di fondamentale importanza.

In questa ultima decade studi molecolari hanno dimostrato che differenti specie di piante sono colonizzate da differenti gruppi di funghi AM (Bidartondo *et al.*, 2002; Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002, 2003; Gollotte *et al.*, 2004; Scheublin *et al.*, 2004; Sykorova *et al.* 2007) e che alcune relazioni pianta-funghi AM avvengono preferibilmente rispetto ad altre. Ad esempio, Helgason *et al.* (2002) hanno dimostrato in esperimenti in vaso che *Glomus hoi*, che è stato ritrovato in campo quasi esclusivamente su radici di *Acer pseudoplatanus*, è l'unica specie di fungo AM, delle quattro analizzate, a dare dei benefici alla pianta in oggetto. Vandenkoornhuysen *et al.* (2002) hanno dimostrato che due famiglie vegetali diverse, Leguminosae e Graminaceae, avevano nelle loro radici differenti comunità fungine. Tali differenze si mantenevano anche analizzando solo la famiglia delle Graminaceae (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2003).

La specificità d'ospite in senso stretto, e cioè una pianta ospite colonizzata solo da un ristretto gruppo di taxa fungini, è stata dimostrata solo per i membri micoterotrofici delle Gentianaceae (Bidartondo *et al.*, 2002). Proprio per questo la definizione "preferenza d'ospite" risulta più corretta. Alcuni autori (Scheublin *et al.*, 2004) hanno suggerito che le piante ospiti possono avere vari livelli di specificità per i funghi AM che possono variare da specialista selettivo fino a generalista non selettivo. Questo concetto è stato proposto anche da Borstler *et al.* (2006) e Opik *et al.* (2006), confermando nei

loro studi che alcune specie di funghi AM sono presenti sempre e ovunque, tanto da avere una bassa specificità. Ad esempio il fungo *Glomus intraradices* sembra essere un generalista, perché normalmente viene ritrovato in qualsiasi tipo di ambiente.

Recentemente sono stati studiati anche i cambiamenti indotti dalla specie ospite su alcuni caratteri fungini AM, quali la struttura e l'interconnessione della rete ifale ed è stato dimostrato che sullo stesso fungo specie vegetali diverse inducevano la formazione di reti ifali di struttura diversa (Giovannetti *et al.*, 2004). Al contrario, quando sono stati studiati i medesimi caratteri fungini legati alla rete ifale extraradicale in diversi isolati fungini della stessa specie su una singola pianta ospite sono state osservate differenze significative nei parametri fisiologici e funzionali tra gli isolati, dimostrando in tal modo che possono esistere livelli diversi di risposta in relazione alla stessa pianta (Avio *et al.*, 2006).

1.5 Filogenesi e tassonomia dei funghi AM

I funghi AM rappresentano uno dei gruppi di funghi maggiormente diffusi nel mondo e importanti sia dal punto di vista ecologico che da quello economico,.

Una prima classificazione basata su morfologia, sviluppo e struttura della parete delle spore è stata proposta da Morton (1988) e modificata in seguito da Walker e Trappe (1993). Essa comprendeva un ordine, *Glomerales*, nel quale erano incluse tutte le specie che formavano simbiosi micorriziche, considerando questo carattere originale, distintivo dell'ordine (Morton e Benny, 1990). L'ordine delle *Glomerales* comprendeva due sottordini: *Glominae*, comprendente a sua volta la famiglia delle *Glomaceae*, con i generi *Glomus* e *Sclerocystis*, e la famiglia delle *Acaulosporaceae*, con il genere *Acaulospora* e *Entrophospora*; *Gigasporinaea*, con una sola famiglia,

Gigasporaceae, con i generi *Gigaspora* e *Scutellospora*. Questa struttura tassonomica è stata confermata da studi sistematici molecolari (Gehrig *et al.*, 1996, Simon *et al.*, 1993).

Recentemente Schüßler e co-autori (2001), sulla base dell'analisi della sub-unità 18S dell'rDNA, hanno dimostrato che i funghi AM appartengono ad un nuovo phylum monofiletico, quello dei Glomeromycota (Fig. 3).

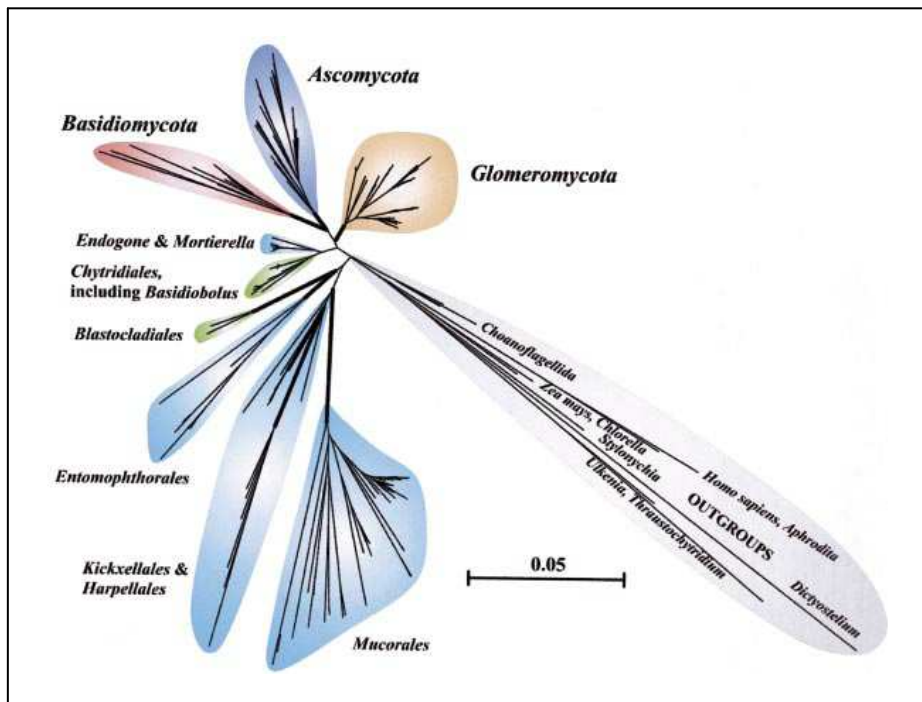


Figura 3. Albero filogenetico dei funghi AM sulla base della sub-unità 18 S dell'rDNA (Schüßler *et al.*, 2001).

Questo gruppo di organismi con un antenato comune, non è imparentato con nessun gruppo di Zigomycota, ma probabilmente condivide un antenato comune con i funghi Ascomycota e Basidiomycota (Schüßler *et al.*, 2001).

Ad oggi il Phylum è diviso in quattro ordini: *Glomerales*, con un'unica famiglia Glomeraceae; *Diversisporales* con le famiglie, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Diversisporaceae* e *Pacisporaceae*;

Paraglomerales, con una sola famiglia, Paraglomeraceae, e Archeosporales con le famiglie Archeosporaceae, Geosiphonaceae e Ambisporaceae (<http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>) (Fig. 4). Gli ordini Paraglomerales e Archeosporales sono considerate linee ancestrali dei funghi AM (Morton e Redecker, 2001).

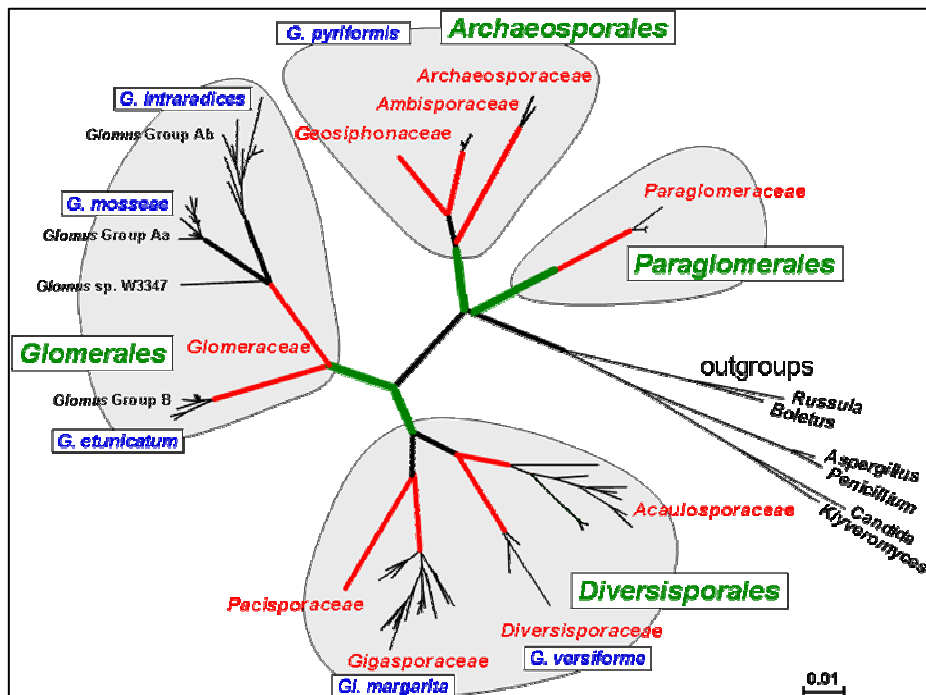


Figura 4. Albero filogenetico del phylum dei Glomeromycota (<http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>).

1.6 Identificazione dei funghi AM

L'identificazione dei funghi AM è tradizionalmente basata sulla caratterizzazione morfologica delle spore. Sulla base di questa sono state descritte circa 200 specie di funghi AM (Morton, 1988; Walker e Trappe, 1993). Poiché le spore, una volta raccolte dal terreno, possono essere: immature, degradate, parassitizzate, oppure aver perso dei caratteri distintivi come l'attacco ifale, elemento essenziale

utilizzato per distinguere la famiglia ed il genere fungino altri metodi si sono sviluppati per la identificazione dei funghi AM.. Per esempio, alcuni autori hanno proposto lo studio della morfologia delle strutture infettive intraradicali (ife, arbuscoli, vescicole) per distinguere i funghi AM a livello di famiglia (Merryweather e Fitter, 1998; Dodd *et al.*, 2000). Inoltre, la presenza delle spore, dipendente dai parametri fisiologici dei funghi AM e dalle condizioni ambientali, può talvolta non essere correlata con la reale colonizzazione radicale delle piante ospiti (Clapp *et al.*, 1995; Merryweather e Fitter, 1998), portando ad una stima ridotta della loro diversità *in planta*.

Benchè la morfologia delle spore raccolte dal terreno rimanga un approccio fondamentale per l'identificazione dei funghi AM negli ecosistemi, la caratterizzazione *in planta* si dimostra importante perché riflette esattamente la popolazione funzionale dei funghi AM. Per studiare la diversità dei funghi AM a diversi livelli tassonomici, direttamente nel suolo e nelle radici, sono stati proposti numerosi markers biochimici: isozimi (Abbott e Robson, 1981; Rosendahl *et al.*, 1989; Rosendahl e Sen, 1992), lipidi (Bentivenga e Morton, 1994; Graham *et al.*, 1995), proteine (Avio e Giovannetti, 1998) e anticorpi (Hahn *et al.*, 1993), ma con limitato successo, soprattutto a causa della necessità di disporre di una grande quantità di materiale biologico per effettuare questo tipo di analisi.

Lo sviluppo di metodologie molecolari ha incrementato notevolmente la conoscenza della diversità genetica di tutti gli organismi, e l'applicazione delle varie tecniche per lo studio dei funghi AM ha permesso di individuare un'ulteriore variabilità all'interno di questo gruppo.

Le tecniche molecolari basate sulle analisi del DNA, in particolare, offrono nuove possibilità per lo sviluppo di marcatori molecolari in grado di caratterizzare questi funghi, non solo per analizzarne le

relazioni filogenetiche e la biodiversità, ma anche per la loro identificazione direttamente nel suolo e *in planta*.

1.7 Metodi molecolari per l'identificazione di funghi AM

Un approccio molecolare si è reso necessario per poter studiare la comunità di funghi AM, sia per obiettivi tassonomici sia sistematici, ma anche per lo sviluppo di metodi d'identificazione in campo. Tutte le tecniche molecolari utilizzate finora sono principalmente basate sulla "Polymerase Chain Reaction" (PCR) (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988), sviluppata per amplificare frammenti di DNA specifici (Helgason *et al.*, 1998; Redecker, 2000; Renker *et al.*, 2002; van Tuinen *et al.*, 1998), oppure sull'uso di primers random nella "Random Amplification of Polymorphic DNA" (RAPD PCR) (Lanfranco *et al.*, 1995) o di microsatelliti (Douhan *et al.*, 2003).

La PCR, basata su primers specifici per certi taxa, apre la possibilità di identificare e di distinguere le specie di funghi AM presenti nelle radici e nel suolo. La separazione degli amplificati ottenuti durante la reazione di PCR deve essere seguita da uno step di screening, poiché i prodotti di amplificazione consistono in frammenti del gene amplificato di organismi multipli coesistenti. Questo è possibile mediante clonaggio dei prodotti di PCR; la selezione per la scelta degli amplificati viene tradizionalmente fatta sulla base di digestioni con enzimi di restrizione "restriction fragment length polymorphism" (RFLP). Questo approccio è stato ampiamente utilizzato negli studi delle comunità fungine AM naturali (Helgason *et al.*, 1998, 1999, 2002; Daniell *et al.*, 2001; Husband *et al.*, 2002a-b; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Tuttavia i cloni derivanti dall'estratto radicale di DNA, riflettono la reale comunità fungina sulla base di tre ipotesi: i) la quantità di DNA fungino estratto da radici di piante con infezioni multiple è proporzionale alla quantità di colonizzazione; ii)

ogni tipo di amplificato è direttamente proporzionale alla concentrazione del suo stampo nell'estratto; iii) ogni tipo di sequenza viene clonata con la stessa efficienza (Helgason *et al.*, 1999).

Alternativamente, i prodotti di PCR della stessa lunghezza, ma di differente sequenza, possono essere separati mediante elettroforesi in gel di acrilammide in un gradiente di denaturazione "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE) (Myers *et al.*, 1987), oppure, molecole di DNA a singolo filamento possono essere separate in funzione della loro composizione "single strand conformation polymorphism" (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Kjølner e Rosendahl, 2000).

Recentemente Croll *et al.* (2008) e Börstler *et al.* (2008) hanno utilizzato anche la regione dell'rDNA mitocondriale per caratterizzare isolati diversi della specie *G. intraradices* e studiarne la preferenza d'ospite.

Un'altra tecnica attualmente molto utilizzata nello studiare le comunità di funghi AM è quella della Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) dove attraverso l'uso di primers fluorescenti e enzimi di restrizione, viene visualizzata la variazione nella sequenza del DNA oggetto di studio (Liu *et al.*, 1997). Questa tecnica è stata utilizzata con successo per caratterizzare comunità fungine ectomicorriziche (Zhou e Hogetsu 2002) ed endomicorriziche (Clement *et al.*, 1998; Osborn *et al.*, 2000; Zhou e Hogetsu, 2002; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2003).

1.8 DNA ribosomale per l'identificazione molecolare.

I primi studi sulle comunità di funghi AM si sono rivolti alle regioni del genoma nucleare che codificano per le sub-unità dei ribosomi, l'rDNA. I geni di questa regione hanno la caratteristica di essere presenti in un alto numero di copie; inoltre, accanto a sequenze altamente conservate come la "Small Sub-unit" - 18S (SSU), la sub-unità 5,8S, e

la “Large Sub-unit” 28S (LSU), coesistono sequenze non codificanti, come gli “Internal Transcribed Spacers” (ITS) ed “Intergenic Spacers” (IGS), che presentano un’elevata variabilità di lunghezza e di sequenza, e per questo si sono rivelati strumenti utili per distinguere isolati diversi all’interno della stessa specie (Lloyd-McGilp *et al.*, 1996; Giovannetti *et al.*, 2003) (Fig. 5).

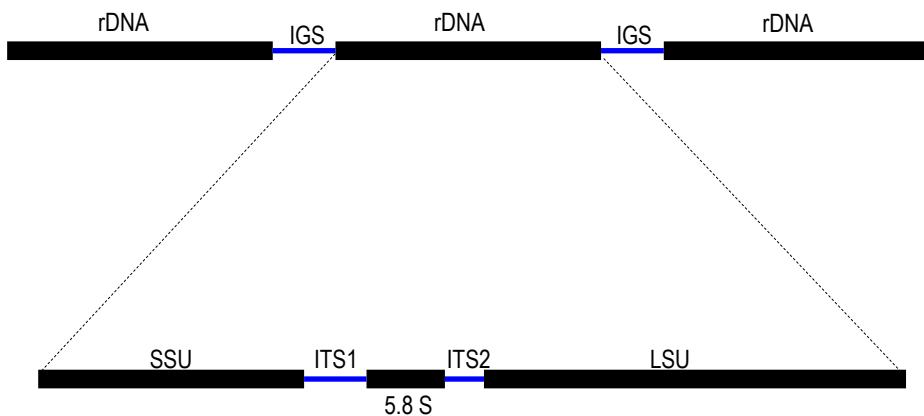


Figura 5. Regione dell'rDNA. Sequenze altamente conservate: “Small Sub-unit” 18 S (SSU), sub-unità 5.8S e “Large Sub-unit” 28S (LSU). Sequenze non codificanti: “Internal Transcribed Spacers” (ITS1 e ITS2) e “Intergenic Spacers” (IGS).

I funghi AM sono stati molto studiati usando come regione marker l'rDNA, e sono stati identificati usando soprattutto l'SSU rDNA (Simon *et al.* 1992; Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 1999; Daniell *et al.*, 2001; Husband *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002), ma anche l'LSU rDNA (van Tuinen *et al.*, 1998; Kjoller e Rosendhal 2000; Geue e Hock 2004; Gollotte *et al.*, 2004; Rosendahl e Stuckenbrock 2004; Farmer *et al.*, 2007), gli spaziatori ITS (Redecker, 2000; Wubet *et al.*, 2003) e ITS e LSU insieme (Bidartondo *et al.*, 2002; Renker *et al.*, 2003).

Helgason *et al.* (1997) hanno disegnato il primer AM1 specifico per i funghi AM che, insieme a NS31 (Simon *et al.*, 1992), primer universale per gli eucarioti, aveva l'obiettivo di amplificare contemporaneamente le principali famiglie dei *Glomeromycota*. Soprattutto il primer AM1 (Helgason *et al.*, 1998) ha rappresentato un passo fondamentale per la caratterizzazione della diversità dei funghi AM in ecosistemi naturali e antropizzati. Questa coppia di primers permette di amplificare una sequenza di ~550 bp dell'SSU rDNA, partendo dal "pool" di DNA totale estratto dalle spore fungine o dalle radici. Helgason e co-autori (1999) hanno dimostrato che l'utilizzazione di questi primers permette l'identificazione di un numero di taxa (tipi di sequenze o genotipi), superiore a quello riscontrabile con i metodi morfologici (Merryweather e Fitter 1998). Dove le tecniche morfologiche hanno dimostrato la presenza di tre generi di funghi AM nelle radici (Merryweather e Fitter 1998), il metodo molecolare ha permesso di identificare almeno otto taxa (Helgason *et al.*, 1999). Uno dei problemi fondamentali della coppia NS31 e AM1 è il fatto che non sono in grado di amplificare funghi AM appartenenti a Paraglomeraceae e Archeosporaceae (Morton e Redecker, 2005; Schußler *et al.*, 2001, Walker *et al.*, 2007)

Recentemente per superare tale problema un nuovo set di primers (AML1 e AML2) è stato disegnato. Tale coppia amplifica la stessa regione amplificata dai primers NS31 e AM1 (Lee *et al.*, 2008) ma permette l'amplificazione delle famiglie di AM precedentemente ignorate. Studi accurati di comparazione di sequenza indicano che i nuovi primers sono in grado di amplificare tutte le sequenze di funghi AM presenti in banca dati, eccetto quelle della specie *Achaeospora trappei*.

1.9 Monitoraggio molecolare di funghi AM

L'uso dei funghi AM come biofertilizzanti in agricoltura può contribuire alla diminuzione dell'inquinamento chimico dei suoli e delle acque, e la loro introduzione può essere una strategia vincente per aumentare i benefici forniti alle piante da questa simbiosi. Ancora pochi sono gli studi in campo sulla capacità dei funghi AM di incrementare la produzione delle piante coltivate (Ryan *et al.*, 2002; Ryan e Angus, 2003). Inoltre, fino ad oggi vi è un solo lavoro dove metodi molecolari per monitorare la persistenza di funghi AM inoculati in campi coltivati sono stati usati (Farmer *et al.*, 2007). Gli autori hanno valutato l'effetto di funghi AM inoculati sulla produttività della patata dolce (*Ipomoea batatas* L.), e la loro persistenza in campo dopo sei settimane dall'inoculazione. L'esperimento, ripetuto per due anni consecutivi, basava la sua strategia molecolare sulla caratterizzazione dell' LSU con una nested PCR. In breve, dopo sei settimane dall'inoculo, il DNA genomico estratto dalle radici veniva amplificato con una coppia di primers eucariotici universali, LR1 e NDL22 (van Tuinen *et al.*, 1998). I prodotti dell'amplificazione con la coppia di primers universali venivano poi usati come stampo per reazioni di nested PCR con coppie di primers diverse che andavano ad identificare ognuna una specie fungina inoculata. Questa strategia ha permesso di verificare la presenza/assenza dell'inoculo fungino utilizzato, che consisteva in isolati di *G. mossae*, *Glomus etunicatum* e *G. intraradices*, e un mix di questi. La presenza di funghi AM nell'estratto era garantita dall'amplificazione con una coppia di primers specifici per ciascuna specie di funghi AM. L'uso di questo approccio ha permesso di valutare con esattezza la presenza dell'inoculo in campo, potendo quindi dimostrare che gli effetti benefici ottenuti sulle colture erano realmente dovuti alla presenza dei funghi AM inoculati.

1.10 Studio della diversità funzionale e caratterizzazione molecolare degli isolati fungini IMA1 e AZ225C della specie *G. mosseae* in campi sperimentali di *M. sativa*

Studi di diversità molecolare e funzionale di due isolati fungini (IMA1 e AZ225C) della specie *G. mosseae* sono stati precedentemente condotti su piante di *M. sativa* oggetto della presente tesi di laurea (Pellegrino 2007). Per quanto riguarda gli studi sulla diversità funzionale, in tale lavoro erano stati presi in considerazione diversi parametri sia fungini che vegetali, quali l'infettività dei singoli isolati fungini, la percentuale di colonizzazione delle piante inoculate in diversi di sviluppo del medicaio, la biomassa vegetale e l'assorbimento di P e N. In ogni caso erano state trovate differenze significative tra piante inoculate e piante di controllo sia dopo un mese, che dopo un anno e due anni dall'inoculazione. Per quanto riguarda la diversità molecolare intraspecifica degli isolati fungini indigeni di *G. mosseae* rispetto a quelli introdotti, Pellegrino (2007) ha condotto un'analisi sia sull'SSU rDNA, sia sull'ITS rDNA derivante dalle spore dei singoli isolati di *G. mosseae* inoculati e dalle radici di diverse specie vegetali usate come piante trappola dove era presente il fungo *G. mosseae* indigeno. L'analisi filogenetica delle sequenze ottenute ha mostrato che la regione ITS2 era in grado di separare le sequenze degli isolati AZ225C e IMA1 dagli isolati indigeni (Fig. 6).

Questi risultati suggeriscono che la regione ITS2 dell'rDNA può essere adatta alla discriminazione di tali isolati anche in pieno campo e che può essere utilizzata per il loro monitoraggio molecolare.

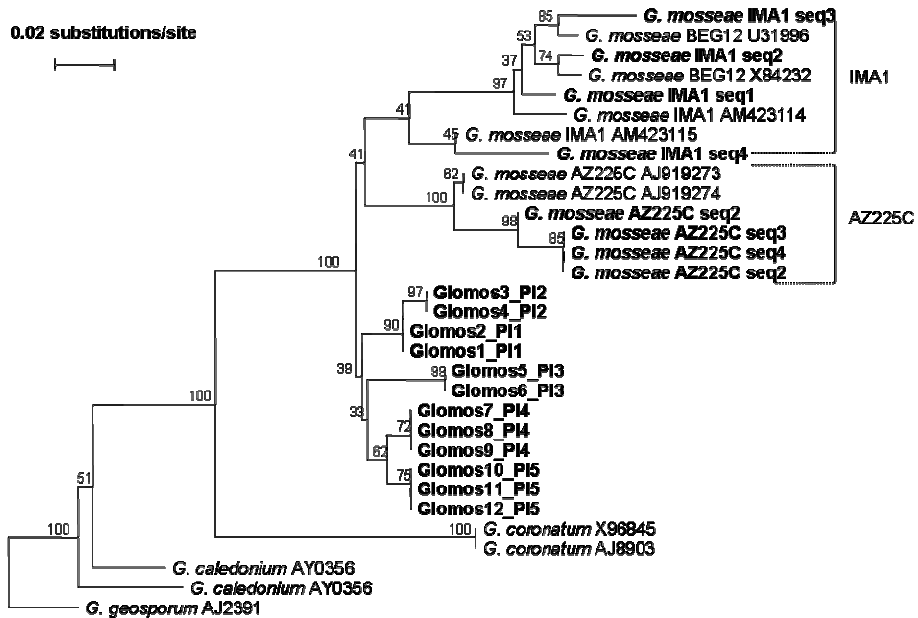


Figura 6. Analisi filogenetica NJ dei Glomeromycota focalizzata alla specie *Glomus mosseae*, e in particolare agli isolati AZ225C e IMA1 inoculati nel sito sperimentale e agli isolati indigeni. Tale analisi è stata ottenuta dall'allineamento di 31 sequenze della regione ITS2 (~ 200 bp). Le sequenze in grassetto sono state ottenute da Pellegrino (2007). *Glomus geosporum* è stato usato come outgroup. I valori di bootstrap (1000 repliche) sono mostrati per valori sopra 30%.